

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE**

**PAR
AHMED LAHSAINI**

**IMPACTS FONCTIONNELS DE L'ANOXIE SUR LES NEURONES
GLUTAMATERGIQUES DE L'HIPPOCAMPE CHEZ DES SOURIS TRANSGÉNIQUES
SUREXPRIMANT LA GLUTATHION PEROXYDASE HUMAINE**

JUIN 1998

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

À ma femme, ma fille Rania, ma famille, ma belle-famille et amis, pour leur support et leurs encouragements.

REMERCIEMENTS

Témoigner sa reconnaissance est un acte privilégié, mis à la disposition de l'auteur pour remercier les gens qui l'ont aidé dans la réalisation de son travail. Cette page peut alors devenir la plus difficile à écrire, car comment, en effet, reconnaître à leur juste valeur les diverses personnes côtoyées au cours de cette maîtrise. Au professeur Guy Massicotte, directeur de mes travaux de recherche, je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude pour sa disponibilité et son dévouement manifesté tout au long de ma démarche scientifique. Ses conseils, suggestions et son soutien m'ont guidé et encouragé dans la poursuite de mes études à la maîtrise et lors de la rédaction de cet ouvrage.

Mes remerciements s'adressent aussi au Dr. M.E. Mirault pour sa précieuse collaboration dans l'accomplissement de ce travail, ainsi que pour ses nombreuses connaissances transmises dans le domaine de la neurobiologie moléculaire.

D'autre part, j'aimerais exprimer ma reconnaissance toute particulière à Tonino Antonetti, Joël Gagné, Chantale Chabot, Luc Lapierre, Othman Ghribi et Luc Marchand qui, de près ou de loin, ont facilité mon travail. Merci à ces partenaires pour leurs encouragements, leurs conseils, leurs opinions et commentaires.

Je voudrais enfin souligner toute ma gratitude à ma femme, ma fille, mes parents, beaux-parents, frères, beaux-frères et amis qui m'ont soutenu durant mes études et qui m'ont permis d'atteindre cette étape importante de ma carrière.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	viii
SOMMAIRE	xi

CHAPITRE 1: INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Nautre et origine des dérivés actifs de l'oxygène	2
1.1 L'anion superoxyde	2
1.2 Le peroxyde d'hydrogène	4
1.3 Le radical hydroxyle	4
1.4 Les hydroperoxydes organiques et leurs radicaux	5
1.5 L'oxygène singlet	6
1.6 Principales sources de DAOs	6
1.7 Dommage oxydatif des lipides, des protéines et des nucléotides	10
2. Rôle de la défense antioxydante dans la prévention du dommage oxydatif	11
2.2 Défenses antioxydantes non-enzymatiques	11
2.3 Défenses antioxydantes enzymatiques	13
2.3.1 Les superoxyde dismutases	14
2.3.2 La catalase	14
2.3.3 Les glutathion peroxydases	15
3. La séléno-glutathion peroxydase (GSHPx)	16
3.1 Structure et fonction de la GSHPx	16
3.2 Localisation de la GSHPx	17
3.3 Rôle de la GSHPx dans l'élimination de radicaux libres	19
4. Intérêt du stress oxydatif dans la neurodégénérescence	21
4.1 Vieillessement normal et pathologique du cerveau	21
4.2 Dommages oxydatifs au cours des accidents vasculaires cérébraux	24
4.3 Rôle du neuromédiateur glutamate dans les dommages oxydatifs	26
4.4 Hypothèse et objectif du projet de recherche	29

CHAPITRE 2: MATÉRIELS ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.

2.1	Approvisionnement en souris transgéniques pour la GSHPx humaine	32
2.2	Mesure de l'expression et de l'activité de la glutathion peroxydase	32
2.3	Distribution immunocytochimique de la GSHPx dans la région hippocampale des souris contrôles et transgéniques	34

CHAPITRE 3: RÉSULTATS

3.1	Profil de la distribution hippocampale de l'expression de la GSHPx chez les souris transgéniques pour la GSHPx	36
3.2	Récupération de la transmission neuronale, après une épisode d'anoxie transitoire chez des souris transgéniques pour la GSHPx humaine	39
3.3	Récupération de la potentialisation à long terme (PLT) après une épisode transitoire d'anoxie chez les souris transgéniques pour la GSHPx.....	51

CHAPITRE 4: DISCUSSION

4.1	Rôle de la GSHPx humaine comme système de protection neuronale	57
4.2	La protection hippocampale et le degré d'expression de la GSHPx	61
4.3	Les propriétés électrophysiologiques et biochimiques des récepteurs au glutamate chez les souris transgéniques pour la GSHPx	65
4.4	La glutathione peroxydase et les maladies neurodégénératives chroniques	67

CONCLUSION.....	71
-----------------	----

RÉFÉRENCES.....	72
-----------------	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Rôle de la calpaine et la NO synthase dans la production des radicaux libres	8
Figure 2. Voies moléculaires de dégradation de l'acide arachidonique par la PLA ₂	9
Figure 3. Diagramme du système enzymatique de la défense antioxydante	13
Figure 4. Réactions de réduction d'un hydroperoxyde par la GSHPx	18
Figure 5. Distribution de l'immunoréactivité de la GSHPx de diverses régions du cerveau	38
Figure 6. Augmentation de l'immunoréactivité de la GSHPx dans la région CA ₁ et CA ₃ de l'hippocampe de la structure hippocampale des souris transgéniques homozygotes (Tg 6 +/+) pour la GSHPx humaine	40
Figure 7. Représentation schématique de l'approche expérimentale pour l'analyse électrophysiologique de la structure hippocampale	42
Figure 8. Récupération de la réponse synaptique après une période transitoire d'anoxie dans la région CA ₁ de l'hippocampe chez des souris non-transgéniques	43
Figure 9. Récupération de la réponse synaptique après une période transitoire d'anoxie dans la région CA ₁ de l'hippocampe chez des souris transgéniques homozygotes (Tg 6 +/+) pour la GSHPx humaine	45
Figure 10. Réduction de la récupération de la transmission synaptique dans des coupes d'hippocampe de souris transgéniques hemizygotes (Tg 6 +/-) pour la GSHPx humaine	47
Figure 11. Récupération de la réponse synaptique après une période transitoire d'anoxie dans la région CA ₁ de l'hippocampe de souris transgéniques (Tg 13 +/+) pour la GSHPx humaine	48
Figure 12. Mesure du degré de viabilité neuronale après une seconde période transitoire d'anoxie dans la région CA ₁ de l'hippocampe des souris transgéniques homozygotes (Tg 6 +/+) pour la GSHPx humaine	50

Figure 13. Le degré de potentialisation neuronale dans des coupes d'hippocampe
de souris non-Tg et Tg 6 +/+ avant une période transitoire d'anoxie53

Figure 14. Le degré de potentialisation neuronale dans des tranches d'hippocampe de
souris non-Tg et Tg 6+/+ après une période transitoire d'anoxie55

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	acide arachidonique
ADN	acide désoxyribonucléique
AVC	accident vasculaire cérébral
AMPA	α -amino-3-hydroxyl-5-méthyl-4-isoxazole propionate
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AP ₃	D-2-amoni-3-phosphopropionate
APP	protéine précurseur de l'amyloïde
ARN	acide ribonucléique
ARN _m	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
Ca ²⁺	ion calcique
CAT	catalase
Cl ⁻	ion chlore
ADN _c	acide déoxyribonucléique complémentaire
DAOs	dérivés actifs de l'oxygène
DAG	diacylglycérol
DLT	dépression à long terme
Fe ²⁺	ion ferreux

Fe ³⁺	ion ferrique
g	gramme
GABA	acide gamma-aminobutyrique
GSH	glutathion réduit
GSHPx	seleno-glutathion peroxydase-1
GSSG	glutathion oxydé
h	heure
HETE	acide hydroxyeicosatétraoïque
HFS	stimulation de haute fréquence (sigle de l'anglais)
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
Hz	Hertz
IgG	immunoglobuline G
IP ₃	inositol triphosphate
Mg ²⁺	ion magnésium
min	minute
msecondes	millisecondes
Na ²⁺	ion sodium
NADPH	nicotiamide adénine dinucléotide phosphate
NMDA	N-méthyl-D-aspartique
nM	nanomololaire

NO [·]	oxyde nitrique
O ₂	oxygène moléculaire
O ₂ ^{·-}	superoxyde
·OH	radical hydroxyle
ONOO ⁻	peroxynitrique
P ₂ A	protéine phosphatase 2A
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PK	protéine kinase
PLA ₂	phospholipase A ₂
PLT	potentiation à long-terme
RL	radicaux libres
RO [·]	radical alkoxy
ROO [·]	radical peroxy
SHF	stimulation à haute fréquence
SNC	système nerveux central
SOD	superoxyde dismutase
TNF-α	facteur de nécrose tumorale alpha

SOMMAIRE

Les accidents vasculaires cérébraux constituent, au Canada comme dans les autres pays industrialisés, la troisième cause de mortalité après les cancers et les affections cardiovasculaires. Ils sont, par ailleurs, la source la plus importante de morbidité et d'invalidité dans le groupe d'âge des 55 ans et plus et la fréquence de cette affection ira sûrement en s'accroissant si l'on considère le vieillissement de la population. Par conséquent, l'une des dimensions les plus importantes de la neurobiologie moderne concerne la compréhension des bases cellulaires et moléculaires sous-jacentes aux processus neurodégénératifs liés à ces conditions.

La survenue d'un accident vasculaire cérébral est normalement la conséquence d'une réduction du débit sanguin en aval d'une occlusion, partielle ou totale, d'une artère cérébrale. Cette suppression de l'apport circulatoire d'une région de l'arbre artériel aboutit, dans la majorité des cas, à une réduction importante du niveau d'oxygénation tissulaire.

Il est maintenant reconnu que l'accumulation de certains déchets cellulaires, qui accompagnent ce manque d'oxygénation représente l'élément clef dans les processus menant à la mort des neurones. Parmi ces composés, il y a de petites molécules, nommées "dérivés actifs de l'oxygène" (DAOs), qui sont capables, de part leur instabilité,

de se fixer à des composantes de la cellule et de les modifier pour perturber leurs fonctions.

Heureusement, la majorité des cellules de notre organisme possède une panoplie de systèmes enzymatiques capables d'amenuiser les effets néfastes des DAOs. Une de ces enzymes est la superoxyde dismutase (SOD). Elle permet, de part son activité, la dismutation des radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène. Une seconde enzyme, la glutathion peroxydase (GSHPx), assure par la suite la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau. Diverses études ont démontré qu'une surexpression de la SOD peut générer une protection neuronale résultant d'une élimination plus rapide du groupement superoxyde. Malheureusement, cette augmentation de l'activité de la SOD, si elle n'est pas compensée par une hausse correspondante de la GSHPx, entraîne irrémédiablement une accumulation importante du peroxyde d'hydrogène. Ce dernier peut provoquer, via une série de réactions secondaires, comme la réaction dite de Fenton, la formation de radicaux hydroxyles, molécules très toxiques pour bon nombre de composantes cellulaires. Il est donc raisonnable de suggérer qu'une surexpression en GSHPx pourrait conférer une protection accrue aux cellules nerveuses en réponse à divers traumatismes cérébraux connus pour favoriser la production de DAOs.

Dans la présente étude, nous avons pris avantage de l'utilisation des techniques d'électrophysiologie afin de préciser si la surexpression de la GSHPx humaine chez la

souris affecte la récupération fonctionnelle des neurones glutamatergiques suite à une période transitoire d'anoxie/réoxygénation. L'analyse spécifique de cette région du cerveau qui est l'hippocampe réside, d'une part, dans sa grande vulnérabilité aux divers traumatismes et, d'autre part, à son rôle crucial dans le stockage de nouvelles informations. Nous rapportons, dans cette étude, que l'imposition d'une période transitoire d'anoxie sur des tranches d'hippocampe engendre une baisse d'environ 60% dans la capacité du tissu nerveux à générer les phénomènes de transmission neuronale au sein des synapses glutamatergiques. De même, une perturbation importante de la capacité des neurones de l'hippocampe à produire le phénomène de la potentialisation à long terme (PLT) est observée suite à cette période transitoire d'anoxie ; la PLT est considérée par plusieurs neurobiologistes comme un modèle électrophysiologique, reproduisant certaines caractéristiques fonctionnelles des neurones lors du stockage de l'information.

Fait intéressant, les tranches d'hippocampe préparées à partir d'animaux transgéniques surexprimant la GSHPx humaine semblent beaucoup moins affectées que les tranches provenant de souris contrôles par cette même période d'anoxie. En effet, une récupération complète de la transmission neuronale est observée dans la région CA₁ de l'hippocampe des animaux transgéniques pour la GSHPx humaine. Par ailleurs, on note également, chez ces animaux transgéniques, une protection neuronale importante en ce qui a trait à la capacité des neurones hippocampiques à générer le phénomène de la PLT suite à cette période transitoire d'anoxie. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent

qu'une protection fonctionnelle des neurones hippocampiques accompagne la surexpression de la GSHPx humaine chez la souris.

Le présent modèle de souris transgéniques pourra sûrement faciliter la compréhension des processus biologiques sous-jacents à la mort neuronale aiguë lors des accidents vasculaires cérébraux. Par l'utilisation de ce modèle animal, nous espérons également, identifier le rôle potentiel de la GSHPx comme mécanisme endogène de protection neuronale, et ce, dans le cadre de situations chroniques de neurodégénérescences associées à la production de radicaux libres, telle la maladie d'Alzheimer.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

L'oxygène est un élément indispensable à la survie de la majorité des êtres vivants, mais il peut devenir très toxique pour ceux-ci dans certaines conditions. En effet, l'oxygène moléculaire peut subir diverses réactions capables de conduire à la production de substances très réactives et particulièrement néfastes à l'intégrité fonctionnelle des composantes cellulaires. De telles substances sont nommées dérivés actifs de l'oxygène (DAOs). Au cours des dernières années, l'intérêt pour les DAOs n'a cessé de croître du fait de leur implication potentielle dans bon nombre de désordres neuropathologiques à caractère neurodégénératif, comme les accidents vasculaires cérébraux (Gutteridge et coll., 1993), la démence de type Alzheimer et la maladie de Parkinson (Subbarao et coll., 1990 ; Martinovits et coll., 1986).

La première section de cette introduction permettra de mettre en lumière la nature et l'origine des dérivés actifs de l'oxygène. Dans la seconde section, le lecteur sera en mesure d'apprécier les mécanismes moléculaires susceptibles de participer, à titre de systèmes endogènes, à la défense cellulaire. Finalement, la troisième et dernière section visera essentiellement à identifier l'implication des dérivés actifs de l'oxygène dans l'apparition des processus de neurodégénérescence dans diverses affections du cerveau.

1. Nature des dérivés actifs de l'oxygène

Le terme "dérivés actifs de l'oxygène" désigne à la fois les radicaux libres de l'oxygène tel l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) ou le radical hydroxyle ($\cdot OH$), et les dérivés de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène singulet (1O_2). Les radicaux libres sont définis comme des espèces moléculaires contenant au moins un électron non apparié sur leur orbitale externe. Les intermédiaires radicalaires sont très instables et ont une durée de vie très courte. Ces radicaux libres ont une réactivité accrue car ils tendent à capter un électron afin de ré-apparier leur électron célibataire. Dans les systèmes biologiques, trois types de réactions peuvent survenir: l'addition radicalaire, le transfert d'électrons ou la capture d'atomes. Ces mécanismes génèrent des réactions en chaîne ne pouvant être interrompues que par la mise en commun de l'électron de deux radicaux libres (Southorn et coll., 1988).

1.1 L'anion superoxyde.

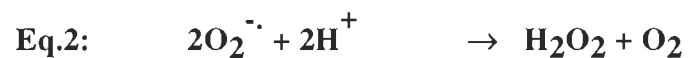
L'oxygène moléculaire possède deux électrons non-appariés et peut accepter un électron pour former l'anion superoxyde (Fridovich et coll., 1983). Cette réduction peut se faire de diverses manières (Eq1). La réaction de réduction peut être catalysée par des systèmes enzymatiques comme les oxydases. Les métaux de transition comme le fer ou le cuivre peuvent aussi facilement céder un électron à l'oxygène. L'anion superoxyde peut être

généralisé lors de l'auto-oxydation non-enzymatique de certaines molécules, comme les quinines et lors de réactions d'oxydoréductions qui ont lieu au cours du transport des électrons dans la chaîne mitochondriale.



1.2 Le peroxyde d'hydrogène

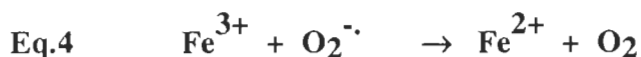
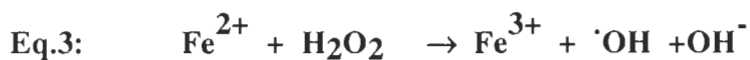
Pour sa part, la formation du peroxyde d'hydrogène découle principalement de la dismutation de l'anion superoxyde en présence de protons (Eq.2). Cette réaction peut avoir lieu spontanément ou être catalysée par les superoxydes dismutases (SOD). La réduction divalente directe de l'oxygène par certaines oxydases dans les peroxysomes engendre aussi la formation du peroxyde d'hydrogène. Ce composé est un oxydant relativement stable et peut facilement diffuser à travers les membranes hydrophobes.

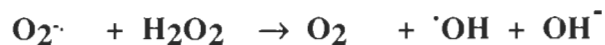


SOD

1.3 Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) est le DAOs le plus réactif connu jusqu'à présent, avec une vitesse de réaction de l'ordre de 10^7 à $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ et une demi-vie extrêmement courte de l'ordre du nanoseconde (Pryor et coll., 1986). Il réagit immédiatement avec presque toutes les biomolécules et ce, directement au site de sa formation. Le radical hydroxyle peut être généré par la réaction du peroxyde d'hydrogène avec certains métaux de transitions comme le fer ou le cuivre. Ce sont les métaux de transition qui catalysent ce type de réactions, qu'elle soit de Fenton (Eq.3) ou de Haber-Weiss (Eq.4) (Haber et coll., 1934). Le radical hydroxyle peut aussi être produit à partir de la décomposition d'un composé très instable, le peroxynitrite, formé par la combinaison de l'oxyde nitrique avec l'anion superoxyde (Eq.5) (Bechman et coll., 1990).







1.4 Les hydroperoxydes organiques et leurs radicaux

Les hydroperoxydes sont formés au cours de la peroxydation lipidique des membranes cellulaires (Halliwell et coll., 1984). Ce mécanisme débute avec une déshydrogénation d'un acide gras poly-insaturé par un radical libre de l'oxygène comme le radical hydroxyle (Eq.6). Le radical alkoxy ainsi formé peut réagir avec une molécule d'oxygène pour générer le radical peroxy (Eq.7). La propagation de la peroxydation lipidique peut alors se poursuivre, car le radical peroxy peut, à son tour, produire d'autres radicaux lipidiques en captant l'atome d'hydrogène d'un acide gras (Eq.8). Les hydroperoxydes sont également produits lors du métabolisme de l'acide arachidonique conduisant à la synthèse des leukotriènes et des prostaglandines (Lands et coll., 1985).



1.5 L'oxygène singulet

Le mode de formation de l'oxygène ($^1\text{O}_2$) singulet est différent de celui des autres DAOs. En effet, c'est par absorption d'énergie que l'oxygène moléculaire, qui se trouve dans un état stable dit de faible énergie, peut passer à un état énergétique plus élevé et instable, dit singulet. Ce composé peut être généré lors de réactions catalytiques impliquant des peroxydases et la combinaison de radicaux peroxytes, et lors de la réaction photosensible produite par des pigments, qui sont des molécules capables d'absorber l'énergie de la lumière pour la transférer ensuite à l'oxygène (Pelmont et coll., 1984).

1.6 Principales sources de dérivés actifs de l'oxygène

Une des principales sources biologiques de DAOs est la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, la consommation de l'oxygène au niveau de la mitochondrie génère de nombreux DAOs (Cadenas et coll., 1989 ; Chance et coll., 1979). Cette production de DAOs a lieu dans les conditions normales de respiration cellulaire et peut être grandement augmentée par un dysfonctionnement de la structure mitochondriale (Boveris et coll., 1976 ; Pryor et coll., 1986). Une autre source importante de formation de DAOs découle de l'activation, par l'ion calcium (Ca^{2+}), de divers mécanismes enzymatiques endogènes (Luft et coll., 1994 ; Halliwell et coll., 1992). Par exemple, lorsque la concentration intracellulaire de calcium s'accroît, un grand nombre d'enzymes, telles les

protéases, les synthases et les phospholipases, peuvent voir leur activité augmenter, favorisant ainsi, la formation des DAOs. Une de ces enzymes, la calpaine, peut activer la xanthine oxydase, laquelle produit des radicaux superoxyde et du peroxyde d'hydrogène (Fig 1) (Musleh et coll., 1994 ; Fridovich et coll., 1970). D'autre part, la NO synthase (NOS), transforme l'arginine présent dans le milieu intracellulaire en NO (Fig 1) (Luft et coll., 1994). De plus, Une autre enzyme, la phospholipase A₂ (PLA₂), active le métabolisme de l'acide arachidonique. Celui-ci par diverses enzymes tels les lipoxygénases et les cyclooxygénases, engendre la formation excessive d'endoperoxydes comme les HPETE, lesquels possèdent un effet similaire aux DAOs (Fig 2) (Ohtsukiet et coll., 1995). Enfin, les métaux de transition sont des éléments clés lors de la genèse de DAOs (Aust et coll., 1985). Les ions métalliques libres sont de puissants catalyseurs dans la plupart des réactions de production de DAOs (Fenton, Haber-wiss, peroxydation lipidique). Le maintien d'un taux minimal d'ions métalliques libres apparaît vraisemblablement crucial pour le bon fonctionnement de tout organisme.

L'auto-oxydation d'une variété de molécules exogènes constitue aussi une source de DAOs. Bon nombre d'agents xénobiotiques ont été identifiés comme potentiels générateurs de radicaux libres. Ces composés peuvent être oxydés et réduits successivement (cycle redox) dans divers systèmes biologiques, avec l'aide de divers systèmes enzymatiques comme catalyseur lors de la réduction. Les quinones, comme la ménadione (Ngo et coll., 1991), les composés bipyridyliques, tel le paraquat (Smith et coll., 1987), et les composés

nitrohétérocycliques représentent la majorité des molécules capables de subir du “rédox-cycling” (Kedderis et coll., 1988).

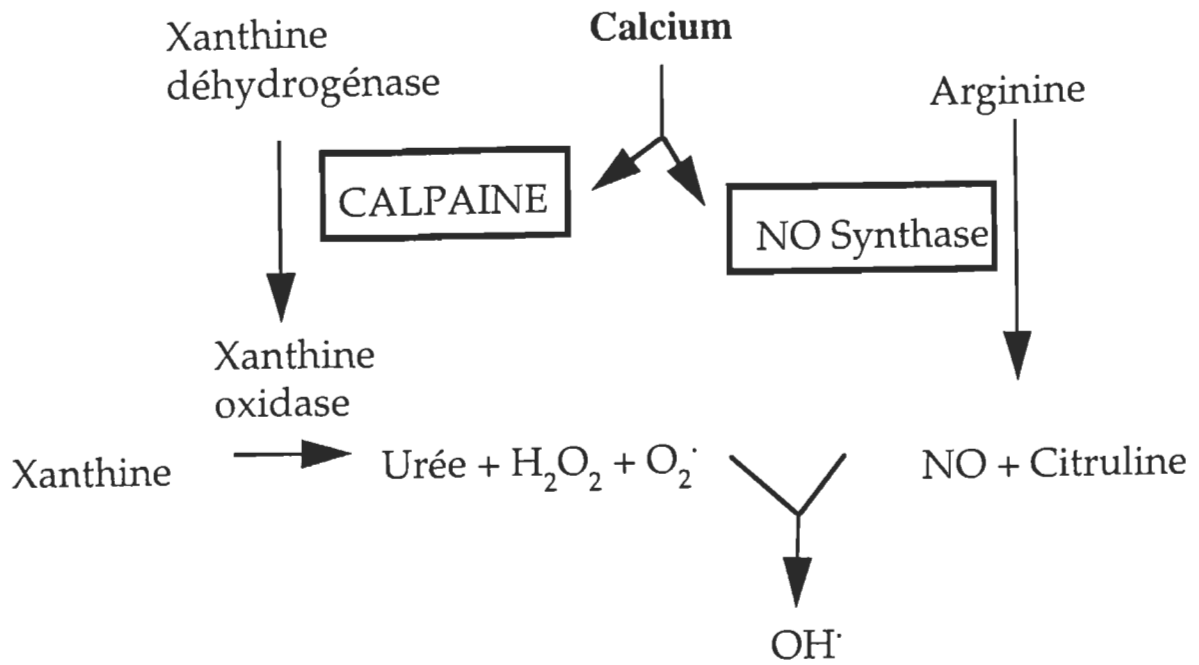


Fig 1 : Rôle de la calpaine et de la NO synthase dans la production des radicaux libres.

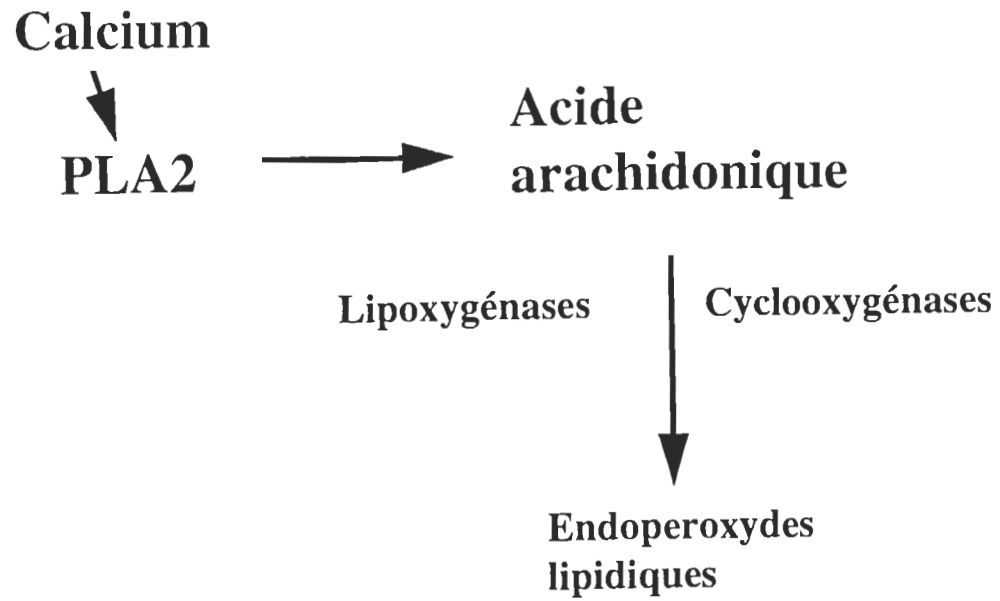


Fig 2: Voies moléculaires de dégradation de l'acide arachidonique par la PLA₂

1.7 Dommmages oxydatifs des lipides, des protéines et des nucléotides

L'exposition de tissus ou de systèmes cellulaires aux DAOs peut engendrer des dommages aux macromolécules biologiques et altérer les structures et les fonctions cellulaires. Par exemple, la décomposition autocatalytique des membranes phospholipidiques induite par l'action des DAOs peut affecter les membranes des différents organites et la membrane plasmique, tant sur le plan structural que fonctionnel. Il peut en résulter une perte de fluidité membranaire, une rupture des fonctions de sécrétion et/ou une perturbation des gradients ioniques transmembranaires, changeant ainsi l'homéostasie cellulaire (Yu et coll., 1992).

Les protéines sont d'autres cibles cellulaires potentielles des DAOs. L'oxydation des protéines peut conduire à la perte de groupes sulfhydryles principalement retrouvés sur les cystéines des sites actifs des enzymes (Stadman et coll., 1991). Ainsi, les protéines oxydées sont plus susceptibles à la fragmentation, à l'agrégation et à la protéolyse (Davies et coll., 1987). Par conséquent, les fonctions biochimiques et physiologiques de à plusieurs enzymes peuvent être modifiées par les processus d'oxydation. Cela peut avoir des répercussions sur l'architecture du cytosquelette et sur la réparation de l'ADN (Floyd et coll., 1992). À cet égard, la majorité des dommages oxydatifs causés à l'ADN ne sont vraisemblablement pas dus à l'attaque directe de l'anion superoxyde ou du peroxyde d'hydrogène (Aruoma et coll., 1989). Le radical hydroxyle, formé près de l'ADN par réaction du peroxyde d'hydrogène

avec des métaux de transition déjà liés à l'ADN, peut réagir avec les bases azotées et le déoxyribose (Simic et coll., 1989).

2. Rôle de la défense antioxydante dans la prévention du dommage oxydatif

Dans le but de prévenir le dommage oxydatif causer aux protéines, aux lipides et aux acides nucléiques, les cellules vivantes ont développé une impressionnante panoplie de mécanismes pour se défendre contre les effets néfastes des radicaux libres. La stratégie antioxydante de la cellule consiste à prévenir la formation de DAOs, à limiter leur production et à convertir ces intermédiaires très réactifs en espèces moins toxiques. Pour ce faire, la cellule utilise des mécanismes enzymatiques et non-enzymatiques. Les différents systèmes de défenses peuvent souvent agir de manière synergique et complémentaire dans le but d'obtenir une fonction antioxydante optimale.

2.1 Défenses antioxydantes non-enzymatiques

La cellule possède un système de défenses non-enzymatiques qui fait appel à différentes molécules (Yu et coll., 1994). On peut distinguer trois groupes de substances antioxydantes. Le premier groupe regroupe toutes les protéines capables de lier les métaux de transitions, ceux-ci étant de puissants catalyseurs lors de la production de DAOs (voir

paragraphe 1). Ainsi, toutes les molécules capables de lier ces métaux et de les rendre non disponibles aux sites de réaction ont une fonction antioxydante. On retrouve notamment les protéines liant le fer, comme la ferritine, celles liant le cuivre, comme la ceruloplasmine, de grosses molécules, comme l'albumine, dans le milieu extracellulaire pouvant lier le fer, le cuivre, et les agents chélateurs exogènes comme la desferrioxamine. Le second groupe comprend les lipides ayant des capacités antioxydantes. La vitamine E (ou α -tocophérol), localisée principalement dans la membrane cellulaire, est un très bon inhibiteur de peroxydation lipidique. Elle est capable, en effet, de terminer la réaction en chaîne en captant les radicaux libres. Le β -carotène fait aussi partie de ce groupe. Le dernier groupe est celui des antioxydants solubles dans l'eau. Dans cette catégorie, on retrouve notamment le glutathion (GSH), co-substrat des glutathions peroxydases, qui peut également interagir directement avec des DAOs comme l'anion superoxyde et le radical hydroxyle. La vitamine C, ou acide ascorbique, est une molécule antioxydante dans les conditions normales mais peut devenir pro-oxydante si la concentration en fer devient trop élevée, car elle peut convertir les ions ferriques(Fe^{3+}) en ions ferreux(Fe^{2+}). L'acide urique est un autre antioxydant capable de capter directement les DAOs et de lier les métaux de transition.

2.2 Défenses antioxydantes enzymatiques

Afin d'éliminer efficacement les différentes DAOs, les cellules de mammifères possèdent aussi plusieurs enzymes antioxydantes réparties en 3 familles selon leurs structures et leurs fonctions: la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase (Fig 3).

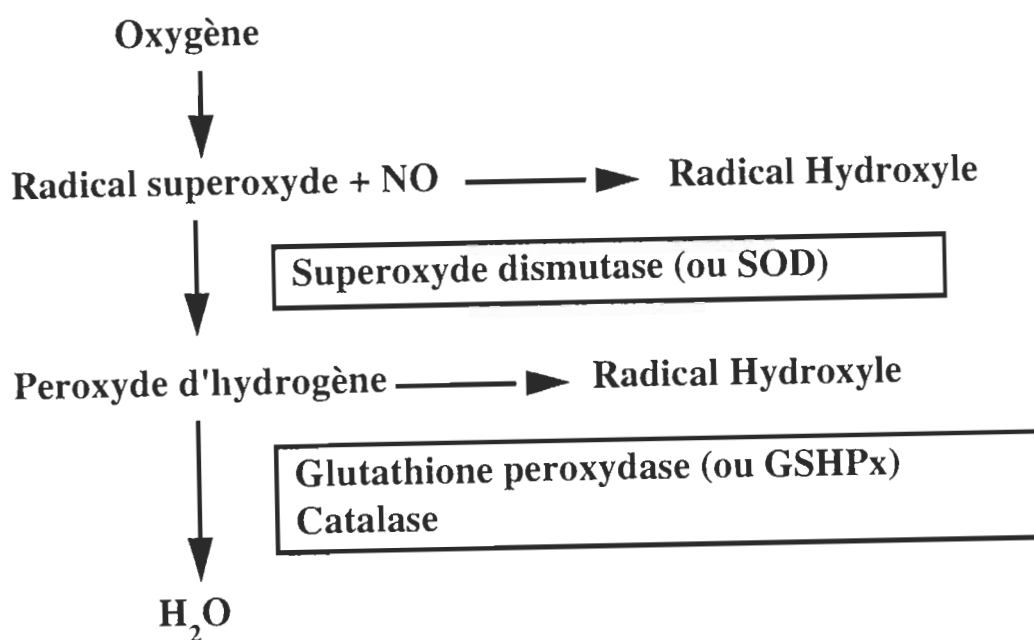


Fig 3: Diagramme du système enzymatique de la défense antioxydante

2.2.1 Les superoxydes dismutases

Tous les organismes aérobies possèdent au moins une SOD, ce qui laisse penser que cette enzyme répond effectivement à un impératif physiologique important. En effet, il existe deux types de superoxyde dismutases, enzymes de la famille des métalloprotéines (Fridovich. et coll., 1970), dans les cellules des mammifères. La Cu/Zn-SOD, que l'on retrouve principalement localisée dans le cytosol et le noyau de la cellule, est un dimère de 32 kD. Le cuivre est essentiel pour son activité catalytique et le zinc pour la stabilité de la protéine (Marklund et coll., 1982). Le deuxième type d'enzymes, la Mn-SOD, est un tétramère contenant deux atomes de manganèse par molécule et qui se trouve localisé principalement dans les mitochondries. Ces deux enzymes catalysent la réaction de dismutation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Yim et coll., 1993). Le rôle physiologique de la SOD est apparu évident depuis la démonstration qu'une mutation dans les gènes qui code pour cette enzyme est souvent associée aux processus neurodégénératifs survenant dans la maladie de la sclérose latéral amyotrophique (SLA) (Hang-Xiang et coll., 1993).

2.2.2 Les catalases

La majorité des catalases sont des molécules composées de 4 sous-unités identiques, avec une masse de l'ordre de 250 kD, que l'on trouve principalement concentrées dans les

peroxysomes. Ces enzymes catalysent la réduction de molécules tels le méthyle hydroperoxyde et le peroxyde d'hydrogène (Deisseroth et coll., 1970). Cependant, elles sont peu efficaces dans l'élimination des composés peroxydes lorsque ceux-ci sont produits à très faible dose (Halliwell et coll., 1989). De plus, les catalases ne semblent pas être absolument nécessaires à la survie des cellules, car leur absence peut être compensée par l'activité endogène de la glutathion peroxydase (Pemont et coll., 1980).

2.2.3 Les glutathion peroxydases

Le dernier groupe d'enzymes connu pour posséder des propriétés antioxydantes importantes sont les glutathion peroxydases. Ce groupe d'enzymes, qui utilise le glutathion comme co-substrat, peut être divisé en deux familles ; les peroxydases séléno-indépendantes et les peroxydases séléno-dépendantes. Les glutathion peroxydases séléno-indépendantes, telle la glutathion-S-transférase, réduisent seulement les hydroperoxydes organiques et non le peroxyde d'hydrogène (Prohaska et coll., 1977). La seconde famille, les peroxydases séléno-dépendantes, comprend quatre enzymes ayant des affinités différentes pour les substrats qu'ils réduisent. La glutathion peroxydase classique, la GSHPx-1, a été la première à être isolée et séquencée. La glutathion peroxydase plasmique (GSHPx-P) (Takahashi et coll., 1987), tétramère de 92 kD se retrouve majoritairement dans le milieu extra-cellulaire. Ces substrats sont, tout comme ceux de la GSHPx-1, le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes organiques. La phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase

(PHGPx), monomère de 20 kD, se distingue de la GSHPx-1 par sa capacité à réduire les hydroperoxydes phospholipidiques liés aux membranes cellulaires. Enfin, la glutathion peroxydase gastro-intestinale (GSHPx-GI) (Chu et coll., 1993) se retrouve seulement dans le tractus intestinal et le foie.

3. Sélénio-glutathion peroxydase (GSHPx)

3.1 Structures et fonctions de la GSHPx

En 1986, le groupe de Harrison clone et séquence le gène de la GSHPx (Chambers et coll., 1986) et Mullenbach séquence par la suite un gène de la GSHPx humaine qui code pour une protéine de 201 acides aminés (Mullenbach et coll., 1987). Nous savons maintenant que, chez l'humain, un gène localisé sur le chromosome 3 et deux pseudogènes localisés sur le chromosome 21 et X codent pour la GSHPx (Mcbride et coll., 1988). La régulation de l'expression de la GSHPx n'est pas très bien connue, mais des régulations développementales, hormonales et chimiques pour l'oxygène ont été observées (Moscow et coll., 1992). À cet égard, deux séquences responsables de la réponse à l'oxygène ont été identifiées à ce jour (ORE1 et ORE2) sur le promoteur du gène de la GSHPx (Cowan et coll., 1993).

Dès 1957, Mills suggéra une participation importante de la GSHPx comme étant une des enzymes assurant la protection des globules rouges contre l'oxydation de l'hémoglobine

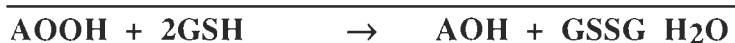
et contre la réaction d'hémolyse (Mills et coll., 1957). En 1973, Flohé et coll. purifient l'enzyme et le cristallisent (Flohé et coll., 1982). La GSHPx apparaît alors sous forme d'homotétramère soluble, contenant une sélénocystéine. Cet acide aminé atypique est maintenant reconnu pour jouer un rôle essentiel dans le mécanisme catalytique de l'enzyme, lui permettant de changer l'état redox des hydroperoxydes (ROOH) qu'elle réduit (Fig. 4).

La GSHPx possède un champ de réaction plus large que les SOD et les catalases. Elle élimine la formation excessive des endoperoxydes découlant du métabolisme de l'acide arachidonique par les lipoxygénases (Lands et coll., 1985). De plus, elle catalyse la réduction de presque tous les hydroperoxydes par l'intermédiaire du glutathion (Flohé et coll., 1982). Le glutathion, co-facteur nécessaire lors de cette réaction, est un tripeptide constitué d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Le glutathion réduit (GHS) est produit à partir de ces acides aminés par l'action concertée de la l-glutamylcystéine synthétase et de la glutathion synthétase.

3.2 Localisations tissulaire et cellulaire de la GSHPx

La GSHPx est présente dans la plupart des tissus, mais on la retrouve à des niveaux très variables selon les organes de l'organisme. Le foie, les reins et les érythrocytes constituent les structures les plus riches en GSHPx (Lawrence et coll, 1974). Sa localisation est aussi très variable selon les régions du système nerveux. Au niveau cellulaire, la GSHPx

est présente dans le cytosol et les mitochondries (Carrier et coll., 1993 ; Zhang et coll., 1989) et cette localisation témoigne, une fois de plus, d'un large champ d'action par rapport aux catalases qui se retrouvent majoritairement dans les peroxysomes.



GSHPx

E-CysSe: Sélénocystéine du site catalytique de la GSHPx.

AOOH: Hydroperoxyde.

GSH: Glutathion réduit. **GSSG:** Glutathion oxydé.

G-6-P: Glucose-6- phosphate. **6-P-G:** 6-phospho-D-gluconolactone.

NADP: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

Figure 4: Réaction de réduction d'un hydroperoxyde par la GSHPx

3.3 Rôle de la GSHPx dans l'élimination des DAOs

La fonction biochimique de la GSHPx concerne principalement l'élimination du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes. L'implication de la GSHPx dans la protection et la résistance cellulaire contre la cytotoxicité induite par différentes insultes a tout d'abord été suggérée suite à des études de modulation de l'activité de la sélénio-glutathion peroxydase par addition ou privation de sélénium (Geiger et coll., 1991; Geiger et coll., 1993).

Les récentes techniques de transferts de gènes offrent la possibilité de produire des modèles expérimentaux mieux adaptés pour contrôler la surexpression, la réduction ou l'élimination de l'activité enzymatique. Ainsi, des modèles *in vitro* de surexpression en GSHPx ont confirmé la relation entre l'activité de cet enzyme antioxydant et la résistance cellulaire à divers traumatismes chimiques connus pour induire la production de radicaux libres. (Mirault et coll., 1991 ; Mirochnitchenko et coll., 1995). Il est reconnu maintenant que les DAOs, et notamment les produits de la réaction de Fenton, médient les dommages causés à l'ADN. Des modèles de souris transgéniques surexprimant la GSHPx humaine ont été récemment produits par divers groupes de chercheurs (Mirault et coll., 1993 ; Mirault et coll., 1994 ; Yoshida et coll., 1996 ; Mirchnitchenko et coll., 1995). Un de ces modèles a été caractérisé, notamment au niveau du système nerveux central, et des préparations de tissus érythrocytaires *in vitro* ont révélé une protection cellulaire contre l'exposition à une toxine connue pour induire la production de radicaux libres. Un autre modèle de souris

transgéniques pour la GSHPx humaine a également été impliqué dans la résistance myocardique suite à une période d'ischémie-reperfusion (Yoshida et coll., 1996). La résistance neuronale en réponse à une période d'anoxie n'a toutefois pas été évaluée chez ces souris transgéniques pour la GSHPx humaine.

Les modèles transgéniques sont aussi des outils de choix qui permettent d'investiguer les modifications moléculaires induites par les DAOs et d'identifier les substances ou les voies de signalisation cellulaire potentiellement responsables des réponses médiées par les DAOs. Ainsi, il a été démontré que la surexpression dans le cerveau de la GSHPx humaine confère aux souris transgéniques un phénotype de thermosensibilité corrélé à une inhibition importante de la synthèse des protéines du shock thermique de type HSP70 (Mirchnitchenko et coll., 1995). Les DAOs semblent aussi être des médiateurs dans la régulation d'une variété de gènes, comme les molécules d'adhésion et les cytokines, par action sur le facteur de transcription NF- κ B (Kretz-Rémy et coll., 1996). En effet, la surexpression de la GSHPx permet d'inhiber la phosphorylation de I κ B- α , une protéine de rétention du facteur de transcription NF- κ B, ainsi que la dégradation du complexe NF- κ B cytoplasmique nécessaire à l'activation de ce facteur de transcription. L'importance fonctionnelle de ces mécanismes moléculaires de régulation par la GSHPx demeure toutefois à préciser.

4. Intérêt du stress oxydatif dans la neurodégénérescence

Le maintien de l'homéostasie cellulaire est nécessaire à la survie de toutes les cellules vivantes. Un équilibre permanent entre la production de DAOs et leur détoxification est nécessaire afin de préserver l'état rédox de la cellule. Un stress oxydatif peut être défini comme une perturbation de cette balance en faveur des DAOs, conduisant à des dommages au niveau cellulaire. Ce stress peut résulter soit d'une génération de DAOs dépassant les capacités antioxydantes de la cellule, soit d'une diminution des défenses antioxydantes ou des systèmes de réparation, ou soit les deux à la fois. Dans certaines affections liées à la sénescence, tels la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou lors des accidents vasculaires cérébraux, on a pu démontrer une association, du moins partielle, à des conditions de stress oxydatif (Congy et coll., 1995 ; Subbarao et coll., 1990 ; Chan et coll., 1996).

4.1 Le vieillissement normal et pathologique du cerveau

Le système nerveux central semble être particulièrement vulnérable au stress oxydatif. Le cerveau, de par la composition de ses membranes cellulaires, contient une concentration élevée d'acides gras polyinsaturés, substrats des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique. On retrouve aussi des régions du cerveau particulièrement enrichies en fer, comme la substance noire (Harrison et coll., 1968 ; Hill et coll., 1984). Les niveaux

d'enzymes antioxydants au niveau du cerveau sont particulièrement faibles comparativement à d'autres tissus de l'organisme (Zhang et coll., 1989), ce qui lui confère une susceptibilité particulière aux DAOs. À cet effet, une altération progressive de la phosphorylation oxydative mitochondriale a été rapportée dans les cerveaux âgés humains et d'animaux et on a pu observer une augmentation du niveau de DAOs dans les mitochondries et les peroxysomes au cours du vieillissement (Bandy et coll., 1990 ; Benzi et coll., 1992 ; De-la-Ascunciuon et coll., 1996).

Selon la théorie radriculaire du vieillissement d'Harman (Harman et coll., 1956 ; Harman et coll., 1981), les agressions oxydantes successives lors du vieillissement créent des conditions de déséquilibre en faveur de l'action des agents pro-oxydants (Pacifici et coll., 1991) qui conduisent à de nombreuses modifications moléculaires, notamment au niveau des lipides membranaires poly-insaturés, des protéines et des acides nucléiques (Pacifi et coll., 1991). Par exemple, avec l'âge, les mécanismes de défense cellulaire pourraient devenir moins efficaces et ce, du fait de l'inactivation oxydative des nombreux enzymes antioxydants, comme la superoxyde dismutase et la GSHPx (Crastes et coll., 1990).

La période du vieillissement est bien connue pour favoriser l'apparition de maladies neurodégénératives chroniques. La maladie d'Alzheimer constitue la première cause de neurodégénérescence chronique lors du vieillissement. Elle se caractérise par un vieillissement prématuré du cerveau lié à une perte rapide des fonctions cognitives et à une détérioration marquée du tissu nerveux. Cette affection représente une des causes les plus

fréquentes des cas de démence (Richie et coll., 1994) et fut rapportée pour la première fois en 1907, par Alois Alzheimer. Celui-ci décrivit le cas d'une femme de 51 ans décédée des suites d'une démence. Ce cas fut d'abord perçu comme un changement de personnalité, mais Alzheimer remarqua une importante détérioration de la mémoire et des fonctions cognitives.

La maladie d'Alzheimer se caractérise aussi d'un point de vue histochimique, par la formation, dans le cortex cérébral, de plaques séniles et d'une dégénérescence neurofibrillaire. Les neurofibrilles sont composées de faisceaux de filaments fibrillaires intraneuronaux organisés en double hélice, et peuvent être visualisées par des anticorps dirigés contre la protéine tau (Brion et coll., 1994). Cette protéine appartient à une famille de protéines d'environ 45 à 68 kDa produites après épissage alternatif d'un gène unique (Goedert et coll., 1989). Les plaques séniles, quant à elles, sont des lésions extracellulaires contenant un noyau dense de fibres amyloïdes. Bien que les dépôts amyloïdes extracellulaires soient présents dans le cerveau de sujets normaux âgés, leur densité est généralement beaucoup plus importante dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. La nature biochimique des fibres fut déterminée à partir de ces dépôts amyloïdes cérébrovasculaires décrits dans plus de 90 % des cas de maladie d'Alzheimer. À partir de ces fibres, un petit peptide d'environ 4 kDa appelé peptide β amyloïde (P β A) a été purifié (Glenner et coll., 1984). Le P β A, formé de 39 à 42 acides aminés, provient d'un précurseur plus grand, le précurseur du peptide amyloïde (APP), une glycoprotéine transmembranaire (Kang et coll., 1987).

Certaines études suggèrent une contribution de radicaux libres dans la maladie d'Alzheimer (Koh et coll., 1990 ; Mattson et coll., 1992 ; Behl et coll., 1992 ; Behl et coll., 1994 ; Yanker et coll., 1990 ; Hansley et coll., 1994). Le haut niveau de peroxydation lipidique observé dans les cerveaux Alzheimer constitue probablement un indicateur fiable des dommages oxydatifs présents chez ces patients (Subbarao et coll., 1990). Par ailleurs, une étude récente vient d'établir un lien entre la neurotoxicité du P β A et la génération de radicaux libres (Annadora et coll., 1996). Cette étude a évalué l'effet du EUK-8, un agent pharmacologique mimant l'action antioxydante de la SOD, sur des tranches d'hippocampe en culture, préalablement exposées à des concentrations croissantes de P β A. Les résultats obtenus ont montré que le EUK-8 protège contre le dommage neuronale induit par le P β A.

4.2 Domages oxydatifs au cours des accidents vasculaires cérébraux

L'accident vasculaire cérébral est un exemple typique de maladie neurodégénérative de nature aiguë. Cette affection neurologique survient essentiellement lorsqu'une partie du cerveau ne reçoit plus le sang nourricier en quantité suffisante pour maintenir son métabolisme normal. Il se produit un défaut d'apport en oxygène et en nutriments divers, comme le glucose, phénomène appelé ischémie (anoxie). Si le défaut en apport d'oxygène n'est que partiel, on parle alors d'hypoxie tissulaire. En revanche, l'anoxie cérébrale représente une perte totale d'oxygénation des tissus. Les dommages cérébraux associés aux

accidents vasculaires cérébraux peuvent avoir lieu pendant la phase de privation en oxygène et/ou de reperfusion tissulaire, c'est-à-dire, lors de la réoxygénation associée au retour du flot sanguin normal. Dans l'état actuel des choses, lorsqu'une personne est amenée à la salle d'urgence d'un hôpital avec des signes d'anoxie cérébrale, il n'y a aucun traitement prouvé qui puisse être appliqué immédiatement pour enrayer les dommages cérébraux en voie d'être produits. Ainsi, l'une des dimensions les plus importantes de la neurobiologie moderne concerne la compréhension des bases cellulaires et moléculaires sous-jacentes aux processus neurodégénératifs liés aux conditions de déprivation en oxygène.

Un rôle de médiateur a été attribué aux DAOs lors des dommages cellulaires occasionnés par une perte momentanée en apport d'oxygène au cours des accidents vasculaires cérébraux. En effet, une production de DAOs, incluant l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et les radicaux nitriques oxydés, a été directement mise en évidence lors de ce type d'affection cérébrale (Cao et coll., 1988 ; Kontos et coll., 1986 ; Kitagana et coll., 1990). L'administration de vitamine E atténue grandement la peroxydation lipidique observée lors de ce type d'insulte (Cadet et coll., 1989). De plus, la modulation du niveau des défenses enzymatiques antioxydants, par une approche de génétique-moléculaire de transfert de gène, permet de faire un rapprochement entre les dommages cérébraux induits par la reperfusion tissulaire et la surproduction de DAOs. Par exemple, il a été démontré que des souris déficientes pour la Cu/Zn-SOD ou la Mn-SOD suite à une activation des gènes respectifs, présentent des dommages cérébraux exacerbés suite à un épisode transitoire d'anoxie cérébrale (Kondo et coll., 1995 ; Mikawa et coll., 1995) ; alors que chez

des souris transgéniques surexprimant la Cu/Zn-SOD, on observe une nette diminution de ces dommages (Kinouchi et coll., 1991 ; Yang et coll., 1994). Par contre, aucune réduction de dommages n'est observée chez les souris transgéniques surexprimant la Cu/Zn-SOD lors d'un épisode d'anoxie cérébrale permanente (Chan et coll., 1993). D'autre part, l'administration de l'ebesen, un sélénio-antioxydant ayant une activité mimétique de celle de la glutathion peroxydase, réduit également les dommages cérébraux suite à un épisode anoxique chez le rat (Dawson et coll., 1995), suggérant qu'une élimination efficace des peroxydes par la GSHPx constitue un paramètre important pour prévenir l'induction des dommages cérébraux dans les AVC.

4.3 Rôle du neuromédiateur glutamate dans les dommages oxydatifs

Le glutamate est relargué par environ 40% des synapses du système nerveux central et constitue le plus important neurotransmetteur de l'activité synaptique excitatrice dans le cerveau (Fonnum et coll., 1984). L'activité dépolarisante du glutamate est couplée à des récepteurs classés en deux familles selon leurs propriétés pharmacologiques et électrophysiologiques: les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et les récepteurs non-NMDA (Greenamyre et Porter). La famille des récepteurs non-NMDA se subdivisent elle-même en plusieurs groupes, dont le groupe des récepteurs AMPA qui assurent à lui seul la majorité des réponses excitatrices de types glutamatergiques dans le cerveau. Les récepteurs

NMDA sont, pour leur part, activer seulement lors de situations d'activités intenses des neurones à glutamate.

L'activation des récepteurs NMDA par les agonistes glutamatergiques entraîne l'ouverture de canaux ioniques responsables, entre autres, d'une entrée d'ions calcium dans la cellule (Thomas et coll., 1995). D'un point de vue physiologique, ces récepteurs sont notamment impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. D'autre part, une potentialisation à long terme (PLT) de la transmission synaptique des neurones glutamatergiques peut être reproduite électrophysiologiquement par des stimulations électriques appropriées. La PLT est reconnue par plusieurs neurobiologistes comme l'un des mécanismes physiologiques susceptibles de favoriser le stockage de nouvelles informations dans le cerveau des mammifères et semble requérir, pour sa formation, l'activation préalable des récepteurs de type NMDA (Bliss et Collingridge, 1993). À cet effet, une inactivation complète du gène codant pour ce type de récepteurs dans la région CA₁ de l'hippocampe confirme son rôle dans la réponse PLT et l'implication de cette forme de plasticité neuronale dans les processus de mémorisation, en particulier ceux liés à la reconnaissance de l'environnement spatial (McHugh et coll., 1996).

Ironiquement, la libération massive du neuromédiateur glutamate serait en partie responsable de la dégénérescence des neurones avoisinant le site de la lésion ischémique (Benveniste et coll., 1991 ; Choi et coll., 1987 ; Faden et coll., 1989). Les dommages cérébraux induits par une période transitoire d'anoxie semblent être largement diminués par

l'administration préalable d'antagonistes glutamatergiques de type NMDA (Choi et coll., 1990), ce qui suggère fortement que ce type de récepteurs participe à cette forme de neurodégénérescence. Des études ont clairement démontré que l'influx du calcium qui suit l'activation des récepteurs NMDA contribue à la production de DAOs, en particulier du radical superoxyde (Lafon-Casal, et coll., 1993). Selon plusieurs neurobiologistes, c'est fort probablement la stimulation d'une protéase par l'ion calcium, la calpaïne I, qui assurerait la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase, enzyme dont l'activité catalytique conduit ultimement à la formation d'anions superoxydes (Dykens et coll., 1994).

L'entrée massive de calcium survenant via les canaux ioniques du récepteur NMDA pourrait aussi engendrer une activation excessive de d'autres systèmes enzymatiques dépendant du calcium, dont les phospholipases A₂ et les synthases. La PLA₂ est connue pour relâcher dans la membrane cytoplasmique un composé, l'acide arachidonique, qui peut lui-même être transformé en différents métabolites secondaires possédant des propriétés oxydantes (Kovalchuk et coll., 1994).

Les synthases permettent, pour leur part, la formation de monoxyde d'azote, molécule que l'on croit susceptible d'agir à titre de second messenger lors de la mise en place des mécanismes biochimiques de la mémorisation. Toutefois, ce second messenger diffuse facilement et réagit très rapidement avec l'anion superoxyde pour former l'anion peroxynitrite, autre molécule très réactive et capable de se décomposer en radical hydroxyle (Choi et coll., 1987). Ces différents processus, associés à l'excitotoxicité du

glutamate, pourraient ainsi contribuer à une production de DAOs lors des phénomènes de neurodégénérescence observés dans les accidents vasculaire cérébraux.

4.4 Hypothèse et objectifs du projet de recherche

L'ensemble des informations recueillies dans la littérature scientifique suggère l'existence potentielle d'un lien entre la formation de DAOs et les processus menant à la mort neuronale. De plus, la première partie de cet ouvrage a permis de mettre en valeur l'importance des systèmes enzymatiques antioxydants comme mécanisme endogène de détoxification cellulaire. Comme nous l'avons mentionné auparavant, la SOD est l'une des voies importantes d'élimination des radicaux superoxydes. Toutefois, étant donné que la SOD ne fait que transformer le superoxyde en peroxyde d'hydrogène, un autre système enzymatique, celui de la GSHPx, est essentiel pour éliminer de façon permanente la toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène. À cet égard, une récente étude a démontré que des cellules humaines en suspension (les cellules T47D) surexprimant la GSHPx humaine, montrent un degré de protection important face aux dommages cellulaires induits par un générateur de radicaux hydroxyles, le menadionne (Lavoie et coll., 1992 ; Mirault et coll., 1991). De plus, des souris transgéniques pour la GSHPx humaine ont démontré une résistance remarquable aux dommages cérébraux causés à la suite d'un choc thermique, une situation connue pour générer la formation de DAOs (Mirochnitchenko et coll., 1995).

À la lumière de ces observations, il est raisonnable de proposer qu'une surexpression en GSHPx pourrait aussi conférer une protection accrue aux cellules nerveuses en réponse à divers traumatismes cérébraux. Dans la présente étude, nous avons pris avantage de l'utilisation des techniques d'électrophysiologie afin de préciser si la surexpression de la GSHPx humaine chez la souris affecte la récupération fonctionnelle des neurones glutamatergiques dans la région CA₁ de l'hippocampe, et ce, suite à une période transitoire d'anoxie. L'analyse spécifique de cette région du cerveau réside, d'une part, dans sa grande vulnérabilité aux divers traumatismes cérébraux, et d'autre part, à son rôle crucial dans l'emmagasiner de nouvelles informations.

La première série d'expériences tentera d'évaluer la capacité qu'ont les neurones de la région CA₁ de l'hippocampe à récupérer leur fonction après une période transitoire d'anoxie. La deuxième série d'expériences portera, pour sa part, sur l'évaluation du degré de potentialisation neuronale suivant cette même période transitoire d'anoxie. La potentialisation neuronale dans l'hippocampe est facilement reproduite après stimulation adéquate des neurones glutamatergiques et consiste en une hausse permanente de la capacité de ces neurones à transmettre l'influx nerveux. Les caractéristiques électrophysiologiques de la potentialisation neuronale se sont avérées, pour les neurobiologistes, pertinentes comme modèle d'étude des mécanismes de la mémoire. Par conséquent, en étudiant l'impact de l'anoxie sur le degré de PLT, nous espérons vérifier comment une surexpression de GSHPx peut contribuer à la protection des processus cellulaires qui, sous-tendent les phénomène d'apprentissage et de mémorisation.

Bref, nous espérons, par cette problématique de recherche, mettre en lumière l'importance de la GSHPx comme mécanisme endogène de neuroprotection pour ainsi être en mesure de cibler de nouvelles avenues pharmacologiques vouées aux traitements de maladies à caractère neurodégénératif.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Approvisionnement en souris transgéniques pour la GSHPx humaine

Selon la procédure décrite précédemment (Mirault et coll., 1994), plusieurs lignées de souris transgéniques furent produites après avoir reçu de 1 à 3 copies de l'ADNc codant pour la GSHPx humaine et ce, sous le contrôle d'un promoteur pour la métallotioneine (hMTII). La présence du transgène a pu être vérifiée pour chacune des lignées de souris transgéniques par analyse subséquente en Southern blot (Mirault et coll., 1994). Les données rapportées dans cette étude furent obtenues avec deux groupes de souris transgéniques homozygotes et hémizygotés provenant des lignées 6 et 13 et ont été comparées à des souris contrôles (non-Tg) du même âge et possédant un bagage génétique commun (B6C3F1).

2.2 Préparation des tranches d'hippocampe pour l'étude des caractéristiques électrophysiologiques de la région CA₁

Les expériences ont été effectuées sur des tranches d'hippocampe d'une épaisseur de 450µm, préparées à partir de cerveaux de souris contrôles et transgéniques (Lee et coll., 1981). L'animal est d'abord anesthésié dans une atmosphère de métopone, et sacrifié par

décapitation. Le cerveau est ensuite prélevé de la boîte crânienne et maintenu dans une solution physiologique froide (4°C) contenant, en mM ; NaCl 124, KCl 5, Na₂PO₄ 1.25, MgCl₂ 1.5, CaCl₂ 2.5, Na HCO₃ 26 et glucose 10. L'hippocampe est ensuite rapidement isolé et placé sur un appareil de coupes permettant la préparation de tranches minces de 450 µm. Les tranches d'hippocampe ainsi obtenues sont par la suite déposées minutieusement dans une chambre pour préparation in vitro dédiée à l'enregistrement de réponses électrophysiologiques. Le tissu est maintenu à une température constante de 35°C avec un débit de perfusion d'environ 1ml/min en présence d'un mélange gazeux (Carbogène) contenant 95% d'oxygène et 5% de CO₂.

Les tranches d'hippocampe sont alors gardées au repos pour une durée minimale de 60 minutes permettant ainsi leur récupération complète. Après cette période d'incubation, des enregistrements de potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSEs) sont obtenus à l'aide d'une micropipette de verre contenant une solution de NaCl (2M). Pour ce faire, l'électrode d'enregistrement est positionnée dans la région CA₁ du striatum radiatum de l'hippocampe afin d'enregistrer les PPSEs évoqués par une électrode de stimulation bipolaire située au niveau des fibres commissurales de Schaffer, et ce, à une fréquence de .033 Hz et les PPSEs évoqués sont amplifiés et enregistrés à l'aide du programme scope sur support informatique IBM. La période transitoire d'anoxie est provoquée par le remplacement du mélange d'O₂ et de CO₂ dans le milieu physiologique par un mélange d'azote (N₂). Dans cette condition expérimentale, la réponse synaptique se trouve réduite et

lorsque la perte des PPSEs est complète, une période de 90 secondes est imposée aux tranches d'hippocampe. À la fin de cette période de 90 sec la réoxygénation du tissu est reprise et le degré de récupération de la transmission synaptique est quantifié par rapport à la ligne de base préalablement établie dans les vingt premières minutes précédant l'imposition de l'anoxie. Dans certaines expériences, nous avons établi le degré de potentialisation neuronale chez les souris contrôles et transgéniques, et ce, avant et après la période transitoire d'anoxie. Une stimulation de haute fréquence (SHF), composée de dix trains formés de 4 stimulations à 100 Hz, lesquels trains étaient espacés d'un interval de 200 msec, fut appliquée afin de générer la potentialisation neuronale dans la région CA₁ de l'hippocampe.

2.3. Distribution immunocytochimique de la GSHPx dans la région hippocampale des souris contrôles et transgéniques

Une analyse immunocytochimique du niveau d'expression de la GSHPx fut établie chez les animaux contrôles et transgéniques pour la GSHPx humaine. Pour ce faire, des cerveaux entiers furent congelés à -20 °C dans une solution de methyl-buthane et furent, par la suite, sectionnés en coupes minces de 14 micromètres. Les coupes de cerveau ainsi obtenues furent utilisées pour l'étude de la distribution de l'expression en GSHPx selon la méthode de trépanier et coll (1996). En bref, des anticorps polyclonaux, purifiés à partir d'un sérum de lapin et dirigés contre la GSHPx, furent déposés sur des coupes de cerveau

préalablement traitées avec 0.3% de H_2O_2 dans 20% de méthanol afin d'inhiber les peroxydases endogènes. Après lavage de la liaison non spécifique des anti-GSHPx au tissu nerveux, un deuxième anticorps couplé à la peroxydase fut ajouté à la préparation afin de révéler le marquage immunocytochimique du premier anticorps. Dans ces conditions, le marquage immunocytochimique se caractérise par un aspect brunâtre de la préparation tissulaire, le niveau de coloration correspondant au niveau d'expression de la GSHPx. Comme nous le constaterons un peu plus loin, l'observation en microscopie photonique révèle la présence d'un degré élevé de GSHPx dans la région hippocampale du cerveau.

Finalement, parallèlement à ces études de distribution de la GSHPx, nous avons quantifié le niveau d'activité enzymatique à partir d'un homogénat de tissu hippocampique. Ici, l'activité de la GSHPx fut établie selon la procédure de Lavoie et coll (1992) utilisant le t-butyl-hydroperoxyde comme substrat de l'enzyme.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Profil de la distribution hippocampale de l'expression de la GSHPx chez des souris transgéniques pour la GSHPx humaine

Dans la présente étude, nous avons pris avantage du développement récent de diverses lignées de souris transgéniques surexprimant la GSHPx humaine pour vérifier l'importance de ce mécanisme endogène de protection cellulaire dans les processus de neuroprotection. Des études effectuées par le groupe de recherche du Dr. Marc-Edouard Mireault de l'Université Laval à Québec, ont révélé que la GSHPx humaine peut être exprimée de manière constitutive dans la majorité des régions du cerveau chez un modèle transgénique pour cet enzyme antioxydant. Les régions du cerveau surexprimant la GSHPx humaine incluent le cortex cérébral, l'hypothalamus, la substance noire et le striatum. Toutefois, comme l'objet de notre étude porte sur le niveau de récupération fonctionnelle de la structure hippocampale, nous nous sommes intéressés à déterminer les niveaux d'expression de la GSHPx dans cette région du cerveau chez les souris transgéniques. La mesure de l'activité en GSHPx au niveau des homogénats d'hippocampe provenant d'une lignée spécifique de souris transgéniques homozygotes (Tg 6 +/+) révèle une légère augmentation de la capacité de l'enzyme à transformer le peroxyde d'hydrogène en eau (Tg 6 +/+ ; 39 ± 2.4 mU/mg), et ce, comparativement aux animaux non-transgéniques (34 ± 1.4 mU/mg, $n=7$, $p < 0.01$). Cette hausse d'activité enzymatique chez ce modèle de souris transgéniques ne

représente, toutefois, qu'une légère augmentation d'environ 15 % par rapport aux animaux contrôles.

Cette faible augmentation d'activité en GSHPx observée pour l'ensemble de cette région du cerveau pourrait toutefois s'expliquer par une compartimentation hippocampale spécifique en regard de l'expression de la GSHPx humaine chez les souris transgéniques. Pour évaluer cette possibilité, nous avons déterminé, à l'aide de la technique d'immunohistochimie, la distribution de la protéine GSHPx chez les souris contrôles et transgéniques homozygotes (Tg 6 +/+) au niveau de la structure hippocampale. La figure 5 montre bien que la distribution en immunoréactivité générée par l'interaction d'un anticorps purifié (anti-GSHPx) avec les protéines endogènes varie, effectivement, selon les compartiments de la région hippocampale. On remarque un marquage abondant et concentré dans les régions CA₁ de l'hippocampe et du gyrus dentelé. De plus, le marquage immunohistochimique de la GSHPx indique que la protéine est particulièrement concentrée dans une portion bien précise de la structure hippocampale, la couche dite pyramidale (PCL). Cette portion pyramidale est normalement caractérisée par la présence de nombreux corps cellulaires de types glutamatergiques, ce qui suggère une distribution abondante de la GSHPx dans ce groupe cellulaire.

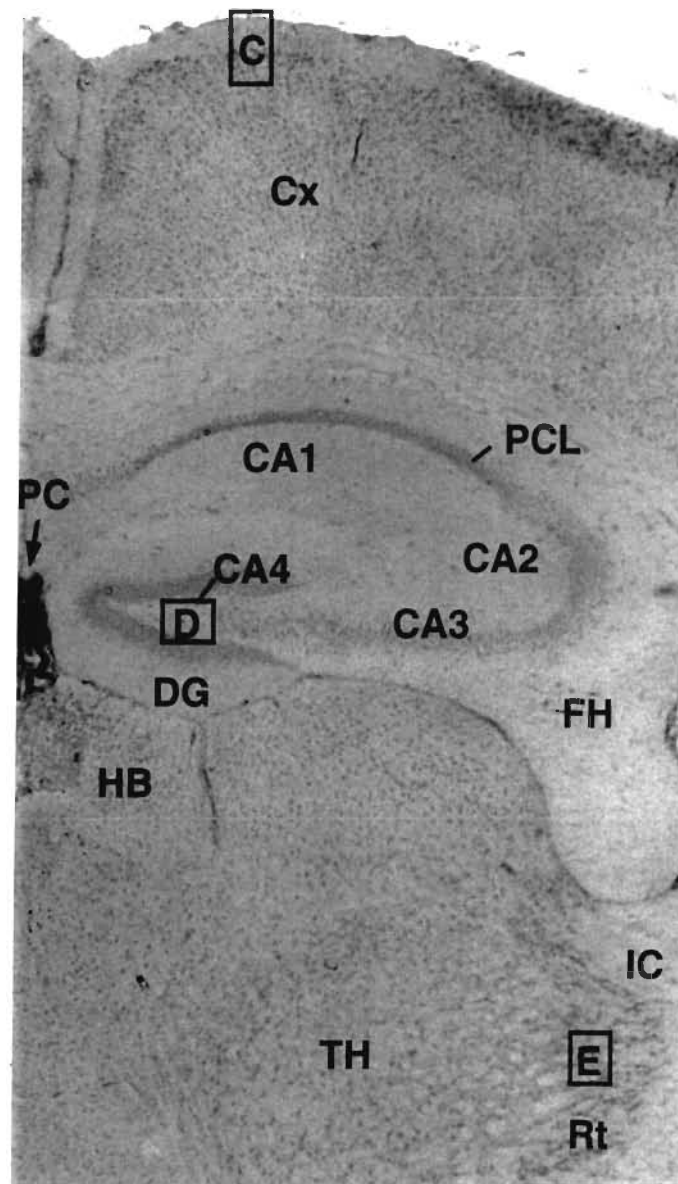


Figure 5: Distribution de l'immunoréactivité pour la GSHPx de diverses régions du cerveau. On note une immunoréactivité importante pour la GSHPx dans les couches pyramidales (PCL) de la structure hippocampale (CA₁, CA₂, CA₃, et CA₄), du gyrus dentelé (DG) et du cortex cérébrale (Cx). Les autres régions du cerveau sont la fimbria hippocampale (FH) ; le noyau habénulaire (HB) ; le plexus choroïde (PC) ; le thalamus (TH) avec le noyau réticulaire thalamique (Rt) et la capsule interne (IC).

Fait intéressant, une augmentation importante de l'immunoréactivité pour la GSHPx est observée au niveau de cette couche pyramidale dans la région CA₁ de l'hippocampe chez une souche de souris transgénique homozygote (Tg 6 +/+) pour la GSHPx humaine, et ce, comparativement aux animaux contrôles (Fig 6). La hausse d'immunoréactivité pour la GSHPx n'apparaît pas limitée à cette région hippocampale car elle est aussi présente au niveau de la région CA₃ chez les animaux transgéniques (Fig 6). Malheureusement, la résolution des données immunocytochimiques n'a pas permis de préciser ou d'identifier quelles sortes de cellules nerveuses surexpriment la GSHPx dans cette lignée de souris transgéniques (Tg 6 +/+). Il n'en demeure pas moins que cette hausse d'activité en GSHPx, que l'on retrouve concentrée au niveau de la couche pyramidale de la région CA₁ de l'hippocampe, pourrait conférer à cette région du cerveau une résistance cellulaire en réponse à divers traumatismes cérébraux.

3.2 Récupération de la transmission neuronale après un épisode transitoire d'anoxie chez des souris transgéniques pour la GSHPx humaine

Il est bien connu qu'un déficit transitoire d'oxygénation peut générer une cascade d'événements biochimiques pouvant conduire à une détérioration préférentielle de certaines régions du cerveau. Compte tenu que la région CA₁ de l'hippocampe est particulièrement

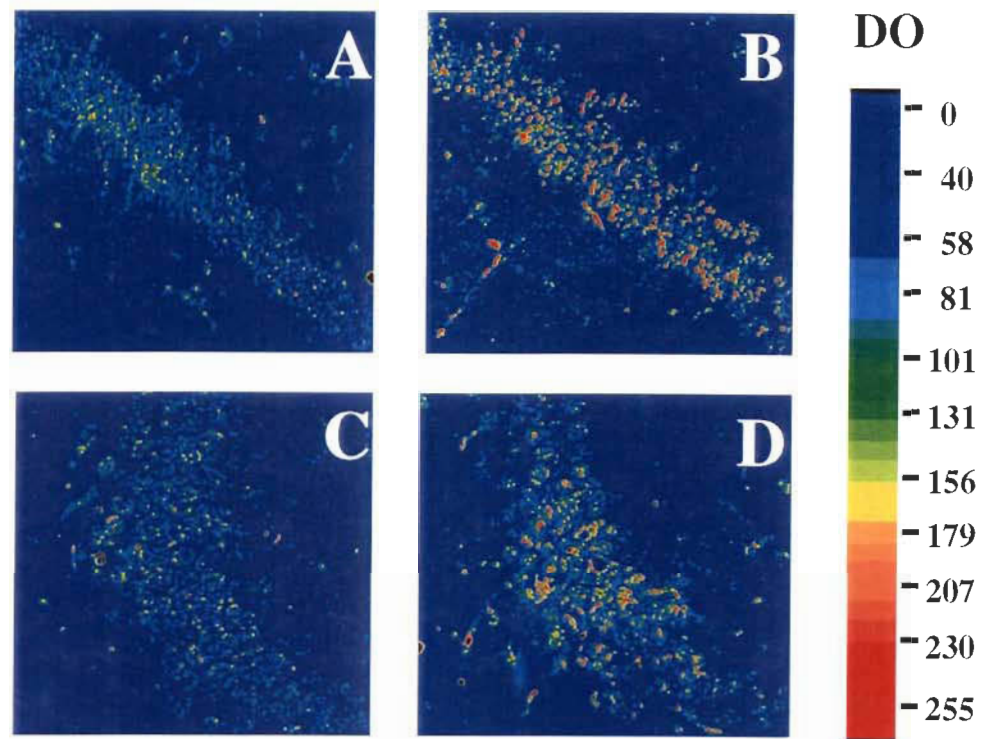


Figure 6: Augmentation de l'immunoréactivité en GSHPx dans les régions CA₁ et CA₃ de la structure hippocampale des souris transgéniques homozygotes (Tg 6 +/+) pour la GSHPx humaine. Représentation couleur du niveau de densité optique (DO) pour l'immunoréactivité de la GSHPx dans l'hippocampe des souris non-Tg et Tg 6 +/+. Les photomicrographies A et C montrent respectivement l'immunocoloration de la GSHPx dans les régions CA₁ et CA₃ de souris non-Tg. Une plus grande immunoréactivité est observée dans les régions CA₁ (B) et CA₃ (D) de l'hippocampe des souris Tg 6 +/+ pour la GSHPx, et ce, comparativement aux souris non-Tg (A et C).

vulnérable à l'anoxie cérébrale, nous avons tiré avantage de l'utilisation des techniques d'électrophysiologie pour déterminer comment une hausse de l'activité en GSHPx dans la portion moléculaire de la région CA₁ de l'hippocampe des animaux transgéniques est suffisante pour exercer un effet protecteur de la fonction neuronale en réponse à l'anoxie. À cette fin, des tranches d'hippocampe, d'une épaisseur d'environ 450 µm, ont été préparées pour être ensuite transférées dans une chambre électrophysiologique de perfusion. Les tranches d'hippocampe furent, dans un premier temps, maintenues au repos dans une solution physiologique pour une durée variant de 60-80 minutes. Après cette période de récupération, des stimulations électriques furent appliquées au niveau des fibres de Scaffer commissurales de la région CA₁ de l'hippocampe afin d'évoquer des réponses synaptiques d'origine glutamatergique. Le glutamate, le principal neurotransmetteur exciteur de l'hippocampe, génère ainsi des potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSEs) capables d'assurer la formation d'une enveloppe de PPSEs telle qu'illustrée à la figure 7. L'analyse de la pente initiale (PI) de cette enveloppe de PPSEs révèle, à elle seule, le niveau d'efficacité des neurones glutamatergiques à transmettre l'influx nerveux.

La figure 8 représente le profil de variation des réponses glutamatergiques dans la région CA₁ de l'hippocampe suite à une période transitoire d'anoxie. Les enregistrements électrophysiologiques débutent évidemment par l'établissement d'une ligne de base qui permet d'apprécier le degré de stabilité fonctionnelle de la préparation in vitro. Dans la majorité des expériences, une période transitoire d'anoxie est produite après 20 minutes

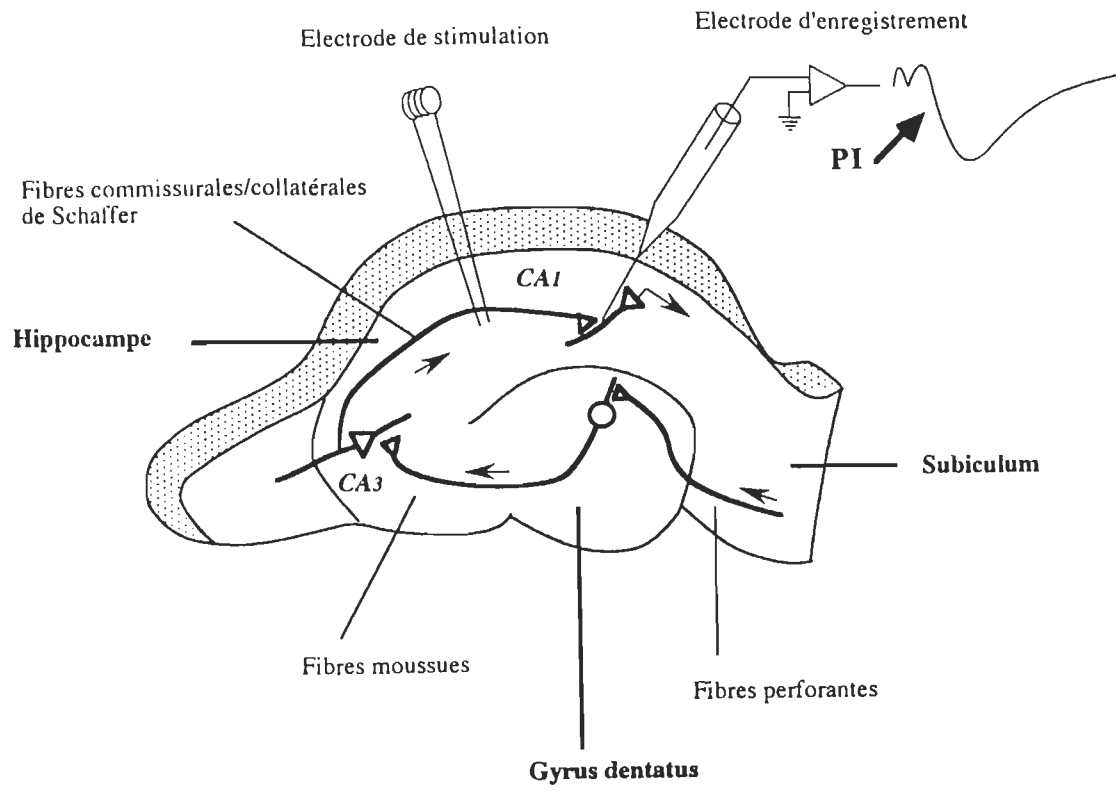


Figure 7: Représentation schématique de l'approche expérimentale pour l'analyse électrophysiologique de la structure hippocampale. La pente initiale (PI) des enveloppes de PPSEs fut considérée comme mesure de l'activité fonctionnelle des neurones glutamatergiques de la région CA₁ dans des tranches d'hippocampe.

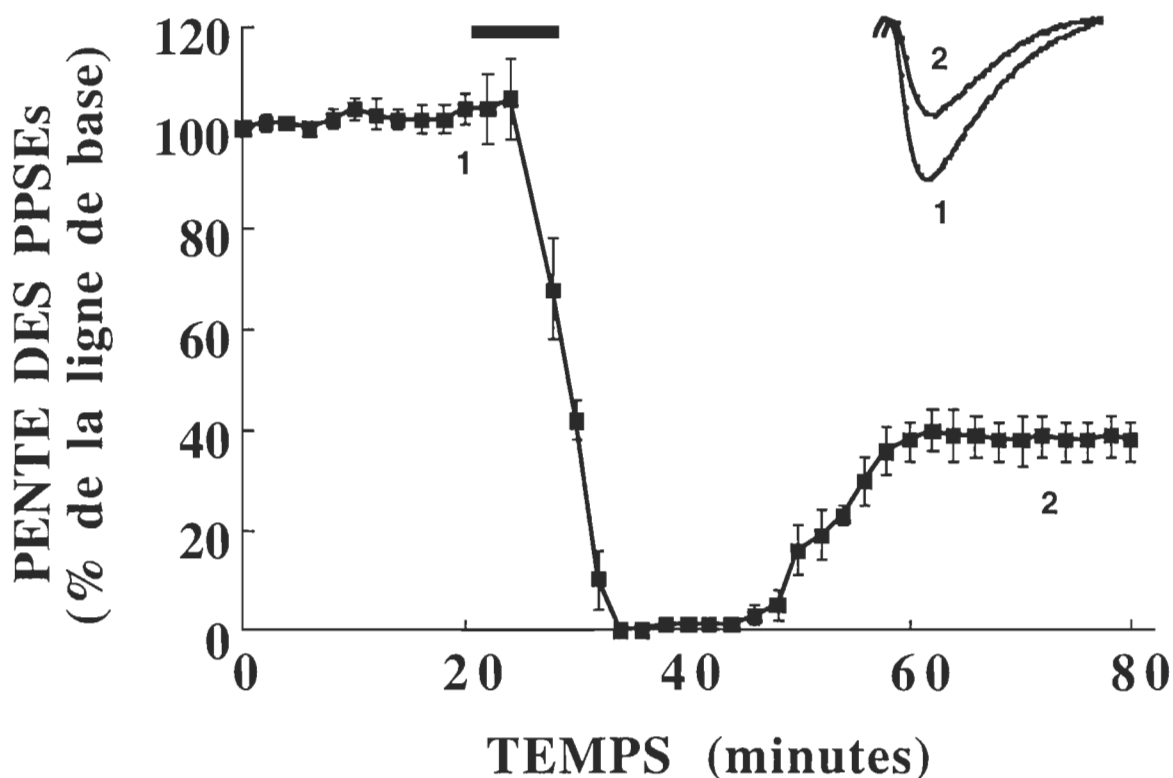


Figure 8: Récupération de la réponse synaptique après une période transitoire d'anoxie dans la région CA₁ de l'hippocampe chez des souris non-transgéniques. Les PPSEs furent évoqués au niveau de la voie commissurale de Schaffer dans la région CA₁ de l'hippocampe. Après un période de 20 minutes d'enregistrement de ligne de base, une période transitoire d'anoxie est administrée pour une durée de 90 sec excédant la perte totale de l'enregistrement électrique de l'enveloppe des PPSEs. La réoxygénation des tranches d'hippocampe est alors reprise. Les données représentent la pente des PPSEs et sont exprimées en pourcentage de la moyenne des PPSEs obtenus au cours de l'établissement de la ligne de base (moyenne \pm erreur type de 13 expériences). Les enveloppes de PPSEs représentées en haut de la figure ont été recueillies 5 min (1) avant et 40 min (2) après l'épisode d'anoxie. Le trait noir indique à quel moment la période d'anoxie a été appliquée.

d'enregistrement de la ligne de base lorsque l'oxygène présent dans le milieu physiologique est remplacé par un mélange d'azote. Ce dernier est administré afin de favoriser l'élimination complète de la préparation tissulaire de l'oxygène résiduel. Ainsi, la substitution de l'oxygène par l'azote engendre une perte graduelle de la transmission neuronale qui atteindra une valeur électriquement nulle dans les 5 à 7 minutes suivant le début de la période d'anoxie. Après l'élimination complète de la transmission synaptique, une période additionnelle de 90 sec d'anoxie est imposée aux les tranches d'hippocampe avant le rétablissement de la réoxygénation tissulaire. Comme il est démontré à la figure 7, l'épisode anoxique cause, initialement, une dépression de la réponse synaptique dans la région CA₁ de l'hippocampe. La réponse synaptique est toutefois récupérée dans les 8 à 10 minutes suivant le début de la réoxygénation. Dans ces conditions expérimentales, la récupération fonctionnelle des neurones hippocampiques représente uniquement 40% de la réponse synaptique moyenne obtenue au cours de l'enregistrement de la ligne de base. La figure 9 illustre le degré de récupération de la transmission synaptique dans des tranches d'hippocampe préparées à partir des souris transgéniques homozygotes (Tg 6 +/+) pour la GSHPx humaine. Tout comme pour les souris contrôles, une période transitoire d'anoxie induit une perte rapide et complète de la transmission neuronale. Ici encore, la récupération fonctionnelle des neurones hippocampiques survient dans les 8 à 10 minutes suivant le début de la réoxygénation, mais cette fois, le degré de récupération apparaît de beaucoup supérieur aux souris contrôles. En effet, on remarque, chez les animaux transgéniques que la récupération de l'enveloppe des PPSEs de la transmission synaptique ($98 \pm 5\%$; Tg 6+/+) est quasi complète dans les 40 minutes suivant l'imposition de la réoxygénation tissulaire, et

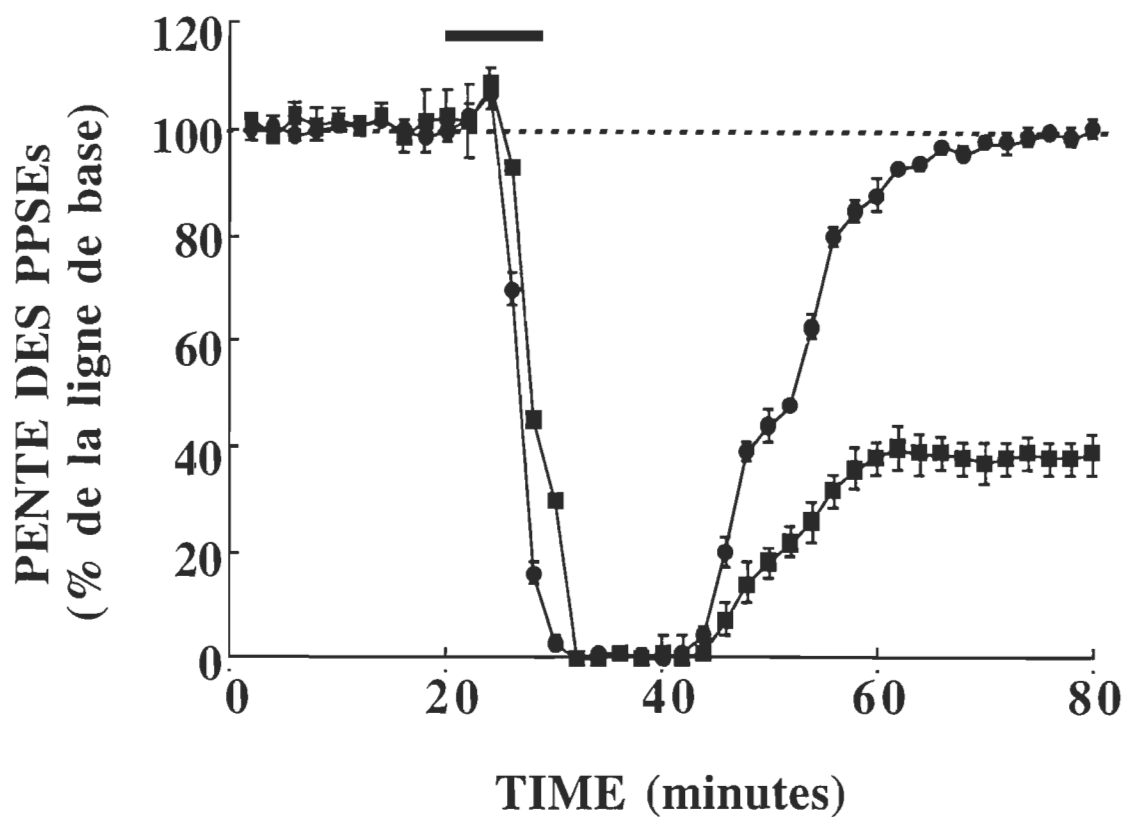


Figure 9: Récupération de la réponse synaptique après une période transitoire d'anoxie dans la région CA₁ de l'hippocampe chez des souris transgéniques homozygotes (Tg 6 +/+) pour la GSHPx humaine. Pour les détails expérimentaux concernant les conditions in vitro d'anoxie, consultez la légende de la figure 8. Les souris contrôles et Tg homozygotes (Tg 6 +/+) sont représentées par des carrés pleins et des ronds pleins. Le trait noir indique à quel moment la période d'anoxie a été appliquée.

et ce, comparativement aux animaux contrôles ($38 \pm 8\%$).

Une analyse de la récupération des réponses neuronales dans la région CA₁ de l'hippocampe a été effectuée chez des souris transgéniques de types hémizygotes (Tg 6 +/-) pour la GSHPx humaine (Fig 10). Le but de cette analyse était de démontrer le lien de causalité entre l'insertion du transgène humain pour la GSHPx et le phénotype de neuroprotection chez la souris. Ici encore, on observe une récupération plus importante de la fonction synaptique suivant une période transitoire d'anoxie par rapport aux animaux non-transgéniques. Cette augmentation de la récupération synaptique est toutefois réduite chez les animaux transgéniques hémizygotes (Tg 6 +/-), et ce, en comparaison aux souris transgéniques de type homozygotes (Tg 6 +/+). Comme on peut le remarquer dans la figure 10, la récupération moyenne de l'enveloppe du PPSEs chez les souris hémizygotes se situe à une valeur moyenne ($65 \pm 5\%$) entre celles obtenues chez les animaux transgéniques homozygotes et les animaux non-transgéniques. Cette récupération partielle de la réponse synaptique chez les souris hémizygotes démontre clairement que le degré de neuroprotection conféré aux souris transgéniques est bien le résultat du niveau de surexpression en GSHPx humaine.

Une deuxième lignée de souris transgéniques fut aussi analysée du point de vue de son phénotype de résistance à l'anoxie (Fig 11). L'étude de la récupération neuronale suite à une période transitoire d'anoxie chez cette deuxième lignée de souris transgéniques homozygotes

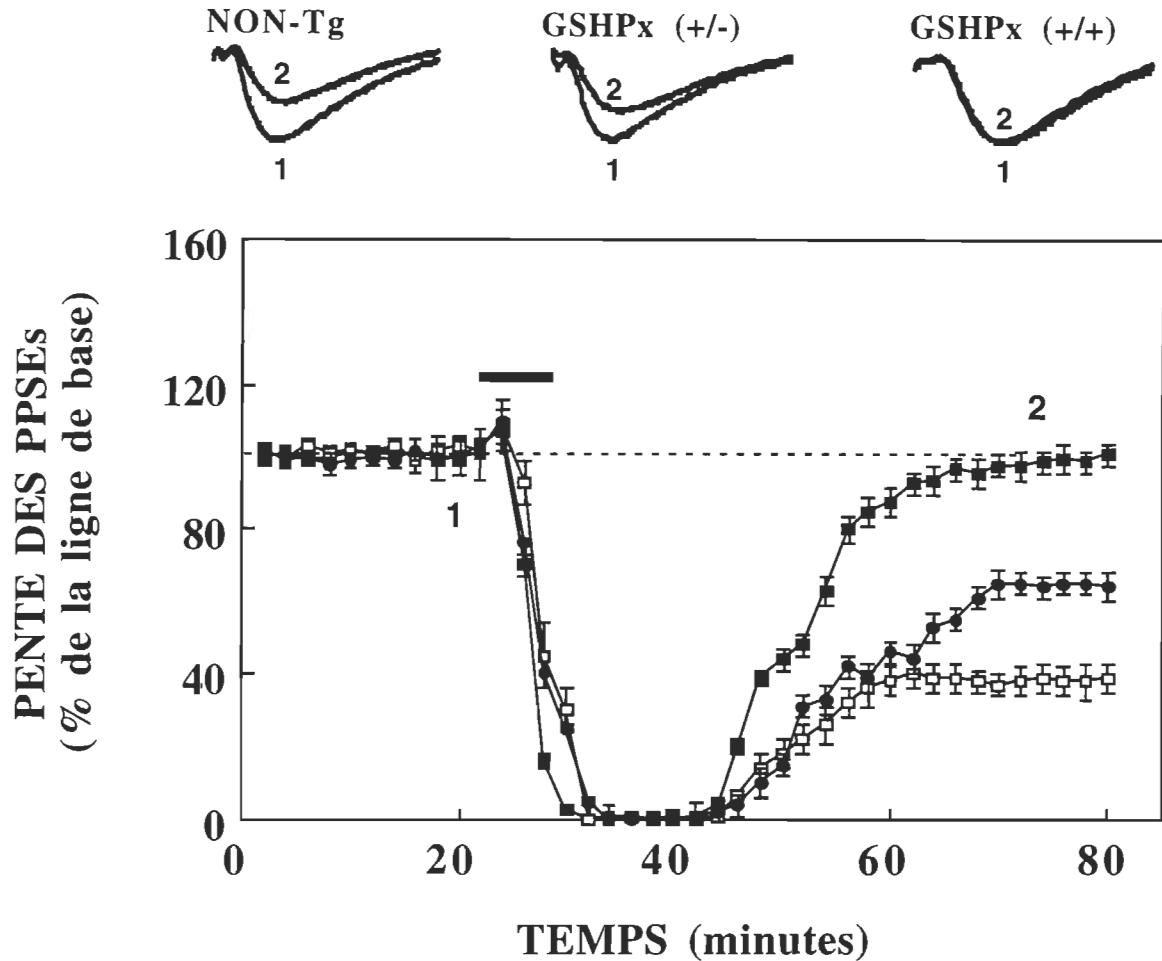


Figure 10: Récupération de la réponse synaptique après une période transitoire d'anoxie dans la région CA₁ de l'hippocampe chez des souris transgéniques hémizygotés (Tg 6 +/-) pour la GSHPx humaine. Pour les détails expérimentaux concernant les conditions in vitro d'anoxie, consultez la légende de la figure 8. Les souris contrôles, Tg homozygotes (Tg 6 +/+) et Tg hémizygotés (Tg 6 +/-) sont représentées respectivement par des carrés ouverts, carrés pleins et des ronds pleins. Le trait noir indique à quel moment la période d'anoxie a été appliquée.

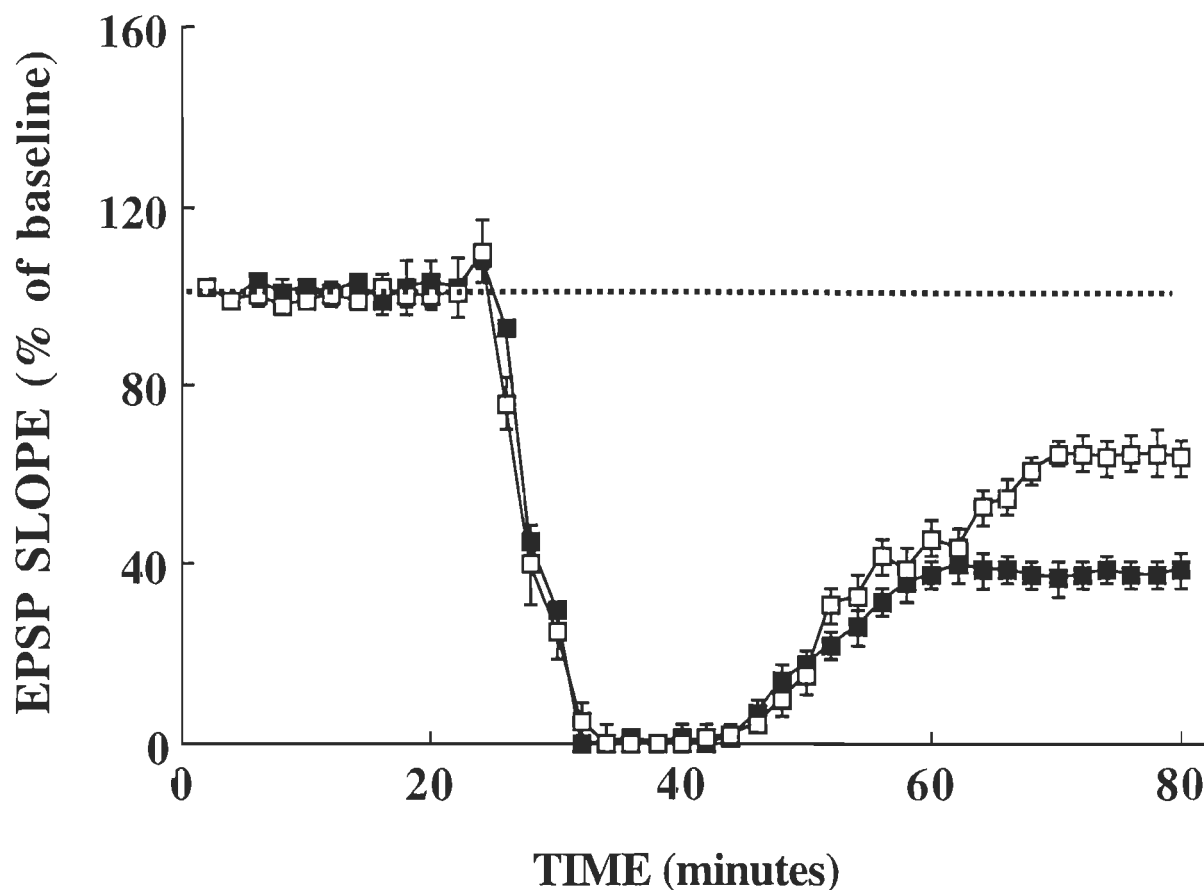


Figure 11: Récupération de la réponse synaptique après une période transitoire d'anoxie dans la région CA₁ de l'hippocampe chez deuxième lignée de souris transgéniques homozygotes (Tg 13 +/+) pour la GSHPx humaine. Pour les détails expérimentaux concernant les conditions in vitro d'anoxie, consultez la légende de la figure 8. Les souris contrôles et Tg homozygotes (Tg 13 +/+) sont représentées respectivement par des carrés pleins et ouverts. Le trait noir indique à quel moment la période d'anoxie a été appliquée.

(Tg 13 +/+) démontre clairement un niveau de récupération supérieur à celui des animaux contrôles. Cependant, la valeur moyenne de la récupération neuronale de cette seconde lignée de souris transgéniques (Tg 13 +/+) apparaît nettement inférieure à la lignée homozygote Tg 6 +/+ (Fig 9). La raison expliquant cette réponse différentielle à l'anoxie pour ces deux lignées de souris transgéniques homozygotes ne semble toutefois pas liée à une différence du niveau d'expression en GSHPx humaine (Mirault et coll., 1994).

Indépendamment de cette observation, les données obtenues chez cette deuxième lignée de souris transgéniques supportent, malgré tout, l'hypothèse voulant que la surexpression de la GSHPx humaine confère bien à la région CA₁ de l'hippocampe une résistance importante à l'anoxie.

La viabilité fonctionnelle des tranches d'hippocampe fût aussi analysée sur la base de la récupération de la transmission synaptique en réponse à une seconde période d'anoxie. Arai et coll. (1990) ont démontré que l'application in vitro d'une seconde période d'anoxie peut, bien souvent, être fatale pour la survie même des neurones glutamatergiques de la région CA₁ de l'hippocampe. En effet, dans ces conditions, un très faible pourcentage de tranches d'hippocampe sont capables de produire des influx nerveux en réponse à des stimulations électriques après une deuxième épisode d'anoxie transitoire. Dans la présente étude, la figure 11 démontre clairement que les souris non-transgéniques voient leur capacité à produire une réponse neuronale, grandement diminuée suite à cette deuxième épisode d'anoxie. Fait intéressant, les tranches d'hippocampe préparées à partir de souris

**TRANSMISSION NEURONALE SUITE
À DEUX PÉRIODES D'ANOXIE
(% de récupération)**

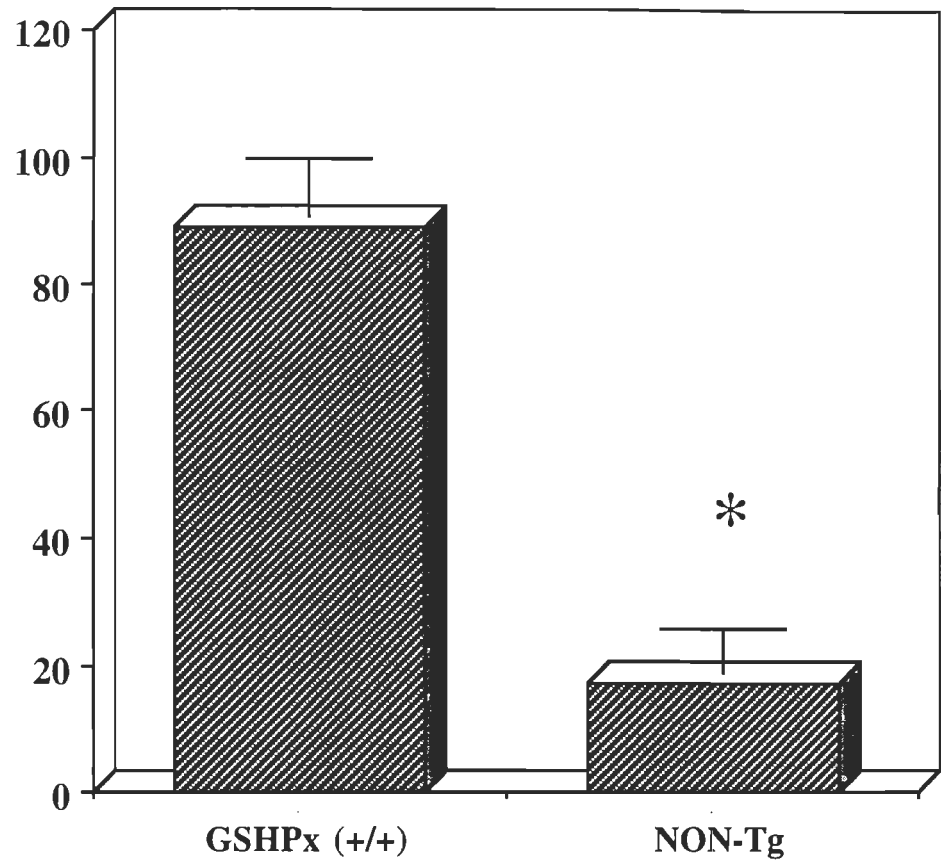


Figure 12: Mesure du degré de viabilité neuronale après une seconde période transitoire d'anoxie dans la région CA₁ de l'hippocampe chez des souris transgéniques homozygotes (Tg 6 +/+) pour la GSHPx humaine. 20 min après l'application d'une deuxième période d'anoxie, les PPSEs furent enregistrés au niveau des tranches de souris non-Tg et Tg homozygotes (Tg 6 +/+) suite à des stimulations d'intensité croissante. Les données représentent le pourcentage des tranches qui ont pu produire une réponse synaptique d'au moins 3 mV dans chaque groupe de souris, et ce, suite à une seconde période d'anoxie (moyenne ± erreur type de 6 expériences, n=18 pour chaque groupe).

transgéniques homozygotes de types (Tg 6 +/+) montrent un degré de résistance remarquable, et ce, même après une deuxième période d'anoxie. Les données révèlent, en effet, que $89 \pm 7\%$ des tranches d'hippocampe d'animaux transgéniques conservent leur capacité à produire des influx nerveux glutamatergiques dans les 20 minutes suivant la fin de l'application d'une seconde période d'anoxie, alors qu'en revanche, seulement $17 \pm 7\%$ des animaux contrôles font de même. Cette expérience suggère fortement que la viabilité même des neurones au glutamate est augmentée chez les souris transgéniques pour la GSHPx humaine après une deuxième insulte anoxique.

3.3 Récupération de la potentialisation synaptique (PLT) après une épisode transitoire d'anoxie chez des souris transgéniques pour la GSHPx humaine

De nombreuses données cliniques révèlent que l'anoxie cérébrale peut, selon son degré, engendrer des troubles graves d'apprentissage et de mémoire. D'un point de vue électrophysiologique, il a été aussi démontré qu'une épisode transitoire d'anoxie peut altérer sévèrement les mécanismes cellulaires permettant l'expression de la PLT dans la région CA₁ de l'hippocampe. Comme nous l'avons souligné précédemment, le phénomène de la PLT dans cette région du cerveau a fait l'objet de plusieurs études de par son intérêt comme modèle électrophysiologique de la mémorisation. Le deuxième volet de cet ouvrage consistera à déterminer comment une augmentation de l'activité en GSHPx humaine chez la souris transgénique peut protéger la fonction hippocampale en regard de sa capacité à produire le phénomène de la PLT.

La PLT est facilement reproduite dans la région CA₁ de l'hippocampe par l'application d'un train de stimulation de haute fréquence, composé de 10 groupes de 4 pulsations à 100 Hz, espacé chacun d'une période de 200 msecondes. Ce profil de stimulation électrique est connu pour reproduire les activités électriques enregistrées dans le cerveau des animaux de laboratoire engagés dans des tâches spécifiques d'apprentissage. La figure 13 montre le degré de potentialisation neuronale généré par cette stimulation de haute fréquence dans la région CA₁ des tranches d'hippocampes préparées à partir des cerveaux de souris contrôles. On peut y remarquer une augmentation maximale de la réponse synaptique qui survient dans les premières minutes suivant l'application de la stimulation tétnique. Cette potentialisation diminue graduellement au cours de l'enregistrement électrophysiologique pour atteindre une valeur d'environ 55% dans les 10 à 15 minutes suivant la stimulation tétnique. À partir de cette période, le niveau de potentialisation neuronale se maintient normalement à cette valeur moyenne pour le reste de l'expérience. Chez les souris transgéniques pour la GSHPx humaine, nous remarquons que l'incorporation du transgène n'affecte aucunement l'apparition et le maintien de la PLT dans la région CA₁ de l'hippocampe. L'analyse des données révèle clairement que le pourcentage d'augmentation de potentialisation synaptique, mesuré dans les 30 minutes suivant la stimulation tétnique, n'est pas modifié chez les souris homozygotes Tg 6 +/+ ($55 \pm 7\%$; n = 7) par rapport aux animaux non-transgéniques ($55 \pm 6\%$; n = 6).

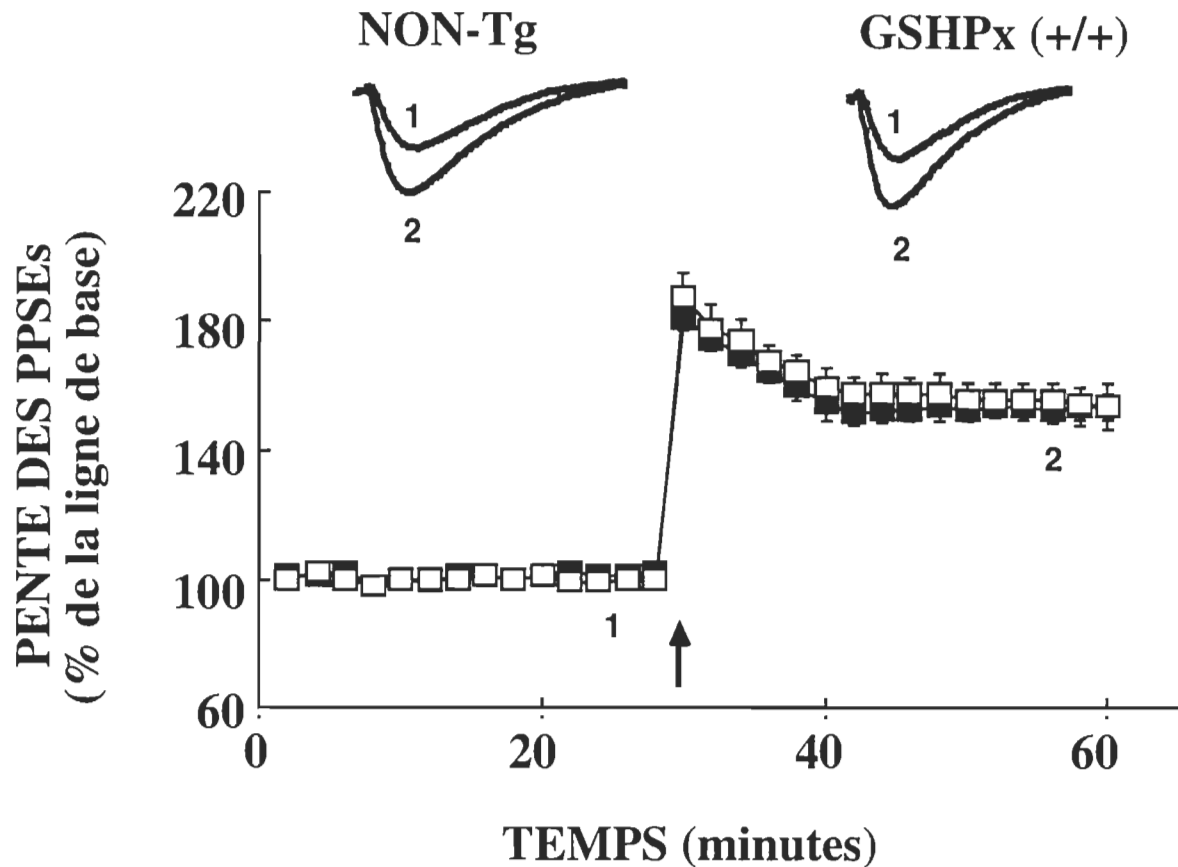


Figure 13: Le degré de potentialisation neuronale dans des tranches d'hippocampe de souris non-Tg et Tg 6 +/+ avant une période transitoire d'anoxie. Les PPSEs furent évoqués au niveau de la voie commissurale de Schaffer dans la région CA₁ de l'hippocampe. Après un période de 20 minutes d'enregistrement de la ligne de base, une stimulation de haute fréquence (SHF) fut administrée (voir secteur méthodes). Les données représentent la pente des PPSEs et sont exprimées en pourcentages de la moyenne des PPSEs obtenus au cours de l'établissement de la ligne de base (moyenne \pm erreur type de 13 expériences). Notez que les souris non-Tg (carrés ouverts) et Tg homozygotes (Tg 6 +/+ ; carrés pleins) montrent des degrés similaires de potentialisation neuronale. Les enveloppes de PPSEs représentées au haut de la figure ont été recueillies 5 min (1) avant et 35 min (2) après l'application de la SHF. La flèche indique à quel moment la SHF a été appliquée.

Fait intéressant, on note que les tranches h'hippocampe de souris transgéniques homozygotes (Tg 6 +/+) conservent une capacité importante à générer la potentialisation neuronale (Fig 14), et ce, en dépit de l'application d'une période transitoire d'anoxie/réoxygénation. Chez ces souris, le niveau de la PLT produit après anoxie atteint une valeur moyenne de près de 40 % ($37 \pm 8\%$), ce qui démontre une fois de plus le rôle primordial que peut jouer la GSHPx endogène comme mécanisme de neuroprotection.

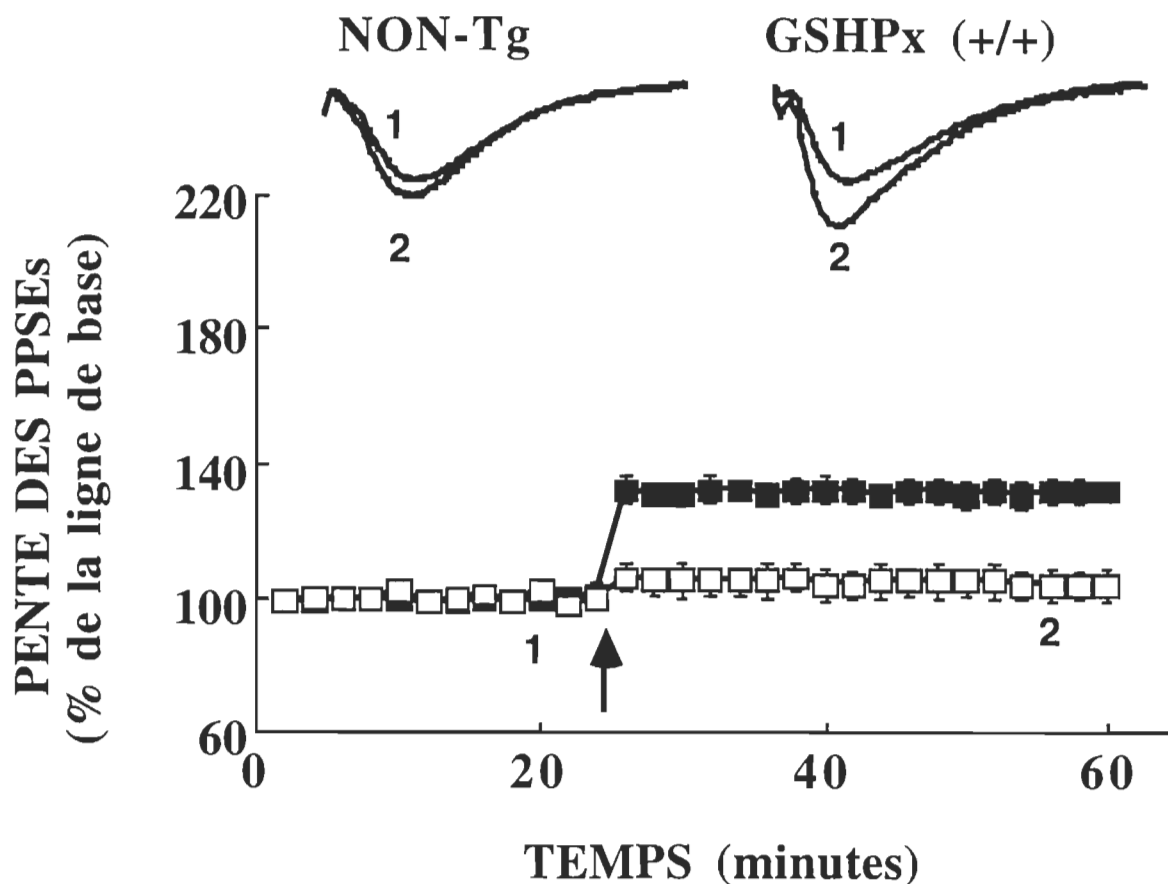


Figure 14: Le degré de potentialisation neuronale dans des tranches d'hippocampe de souris non-Tg et Tg 6+/+ après une période transitoire d'anoxie. Le degré de potentialisation neuronale de l'hippocampe fut établi après l'administration d'une courte période transitoire d'anoxie (5-7 min). Pour les détails expérimentaux concernant l'induction de la PLT, consultez la légende de la figure 13. Notez que les souris Tg homozygotes (Tg 6+/+ ; carrés pleins) montrent un degré de potentialisation neuronale supérieur à celui des animaux non-Tg (carrés ouverts) suite à une période d'anoxie. Les enveloppes de PPSEs représentées au haut de la figure ont été recueillies 5 min (1) avant et 35 min (2) après l'application de la SHF. La flèche indique à quel moment la SHF a été appliquée.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Nul doute que l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à maintenant apporte de précieuses informations sur l'importance de la GSHPx humaine à titre de mécanisme potentiel de détoxification neuronale. En particulier, ces données suggèrent que l'activation de la GSHPx humaine peut constituer une étape préférentielle de protection cellulaire dans les conditions d'anoxie cérébrale. La présente étude est unique dans le sens où elle fournit des indications précieuses sur le type de protection fonctionnelle produite par la surexpression de la GSHPx. À notre connaissance, l'étude du rôle protecteur d'un système cellulaire antioxydant est, pour la première fois, analysé sous l'angle de sa récupération des mécanismes électrophysiologiques représentant les phénomènes de l'apprentissage et de la mémorisation.

Il est clair que ce modèle transgénique est innovateur et fort séduisant pour confirmer l'importance de la GSHPx humaine comme processus biochimique intervenant dans la protection cellulaire, ainsi que pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques vouées aux traitements des accidents vasculaires cérébraux. Cependant, le modèle demeure largement spéculatif quant aux étapes moléculaires conférant cette résistance neuronale en réponse à l'anoxie. Par exemple, pourquoi une protection neuronale complète de l'hippocampe est obtenue dans une seule lignée de souris transgénique surexprimant la GSHPx humaine dans le cerveau? Plusieurs questions sont soulevées par cette observation.

De plus, est-ce que le présent modèle de souris transgéniques (Tg 6 +/+) pourra aider à mieux comprendre les processus biologiques de la mort neuronale survenant lors de l'apparition de désordres neurologiques autres que ceux liés à l'anoxie cérébrale?

La première partie de cette discussion abordera donc l'importance relative de la GSHPx comme mécanisme de protection cellulaire lors de l'anoxie. Par la suite, nous nous interrogerons sur les mécanismes moléculaires pouvant être mis en cause pour expliquer les variations phénotypiques en regard de la résistance à l'anoxie chez nos deux différentes lignées de souris transgéniques (Tg 6 +/+ et Tg 13 +/+) pour la GSHPx humaine. Finalement, la dernière partie de cette discussion traitera de l'utilisation du modèle de souris transgéniques pour la GSHPx comme système d'étude des processus cellulaires de la neurodégénérescence chronique, telle la maladie d'Alzheimer.

4.1 Rôle de la GSHPx humaine comme système de protection neuronale

Un ensemble de résultats provenant de la littérature scientifique tente à démontrer que la période de réperfusion tissulaire qui fait suite aux accidents vasculaires cérébraux constitue l'étape clef de la production d'agents toxiques menant à la mort cellulaire (Cao et coll., 1989). La formation des produits dérivés de l'oxygène contribue à promouvoir les réactions cellulaires dommageables de peroxydation lipidique et l'oxydation de l'ADN, lors de différents dommages cérébraux (Cochrane et coll., 1991).

Sur le plan de la défense neuronale, il est reconnu de plus en plus qu'un trio endogène d'enzymes antioxydants, la SOD, la CAT et la GSHPx, collabore à réduire l'accumulation de radicaux libres générés par le métabolisme cellulaire. La SOD est principalement impliquée dans la dismutation des groupes superoxydes en peroxyde d'hydrogène, lequel composé est subséquentement dégradé en eau par la CAT et la GSHPx (Sies et coll., 1995).

Des efforts importants dans le domaine de la neuropharmacologie sont actuellement consentis afin de découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques vouées à réduire la production et/ou l'action des dérivés actifs de l'oxygène (Dawson et coll., 1994 ; Musleh et coll., 1994 ; Sies et coll., 1995 ; Gill., 1987). De nombreuses études ont démontré que certains composés, possédant des capacités à inactiver les radicaux libres, sont relativement efficaces pour protéger les cellules nerveuses contre divers traumatismes, dont l'anoxie (Mattson et coll., 1994 ; Dawson et coll., 1994). En particulier, des agents pharmacologiques mimant les actions cellulaires de la SOD et de la GSHPx semblent posséder une assez bonne capacité à limiter les effets nocifs de l'anoxie cérébrale dans diverses régions du cerveau (Musleh et coll., 1994). D'autre part, en consultant ces travaux, nous constatons rapidement que l'efficacité de ces composés ne tient compte que très rarement des impacts fonctionnels de ces traitements sur le tissu nerveux. Ainsi, les résultats obtenus lors de ces études font en sorte qu'il n'est pas évident de se prononcer sur la nature fonctionnelle de la protection neuronale engendrée par ces différents composés. Par exemple, comment peut-on s'assurer que les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents aux processus mnésiques sont demeurés intacts lors de ces différents

traitements? Cette considération n'est pas négligeable, car il est bien connu que l'une des répercussions cliniques de l'anoxie cérébrale consiste bien souvent en une perte importante des fonctions d'apprentissage et de mémoire (Pulsinelli et coll., 1982 ; Musleh et coll., 1994).

Tel que mentionné dans l'introduction de ce présent document, il a été proposé que des changements à long terme de la fonction des neurones assureraient fort probablement les processus physiologiques de l'apprentissage et de la mémoire chez les mammifères (Bliss et coll., 1973). Ce modèle électrophysiologique de la mémoire apparaît uniquement dans des conditions adéquates de stimulation électrique à haute fréquence, et il est bien connu que l'apparition de ce processus physiologique est très vulnérable aux dérèglements cellulaires causés par de multiples traumatismes, dont l'anoxie (Cherubini et coll., 1989). En ce qui concerne nos souris transgéniques pour la GSHPx humaine, les études électrophysiologiques démontrent clairement que la surexpression de cette enzyme confère à la région CA₁ de l'hippocampe une résistance fonctionnelle remarquable face à l'anoxie en ce qui à trait aux mécanismes physiologiques de la mémoire. En effet, seuls les souris transgéniques pour la GSHPx montrèrent une capacité à développer le phénomène de potentialisation neuronale suite à une période transitoire d'anoxie. À notre connaissance, aucune étude n'a, jusqu'à ce jour, démontré qu'une stratégie thérapeutique était apte à protéger les neurones à tel point de maintenir les mécanismes biologiques de la mémoire.

À la lueur de cette observation, il devient très plausible d'envisager la GSHPx comme site moléculaire préférentiel de l'élimination des radicaux libres lors de l'anoxie. Cependant, notons que même si l'on s'entend passablement bien dans la littérature sur le rôle crucial des radicaux libres dans la production des dommages cellulaires, leurs origines, selon les types de traumatismes cérébraux, demeurent assez mystérieux. Proviennent-ils directement du métabolisme de base de l'oxygène ou indirectement de la perturbation de systèmes cellulaires connus pour favoriser l'accumulation de radicaux libres? À cet égard, plusieurs auteurs suggèrent qu'un enzyme, la xanthine déhydrogénase, peut voir sa fonction convertie en xanthine oxydase lors de différents traumatismes cellulaires (Betz et coll., 1991). Il est connu que cette dernière possède la capacité de catalyser la production de groupements superoxydes à partir de l'oxygène. Le superoxyde est reconnu par plusieurs chercheurs comme étant particulièrement toxique pour la cellule (Fridovich et coll., 1983).

Le métabolisme de l'acide arachidonique par divers enzymes, tels les lipoxygénases et les cycloxygénases, semble aussi constituer un mécanisme important dans les étapes moléculaires conduisant à la destruction neuronale (Ohtsuki et coll., 1995). La formation excessive des endoperoxydes (HPETE), qui découlerait du métabolisme de l'acide arachidonique par les lipoxygénases, serait particulièrement néfaste pour l'intégrité fonctionnelle de multiples composantes cellulaires. Fait intéressant, il a été démontré que la GSHPx possède une capacité intrinsèque à réduire la formation de ces endoperoxydes en inhibant, d'une part, le métabolisme de l'acide arachidonique, et en favorisant d'autre part, leur élimination sous forme de composés inactifs (HETE) (Fulvio et coll., 1984).

Le présent modèle de souris transgéniques nous sera des plus utiles pour déterminer l'implication relative de ces systèmes moléculaires dans l'apparition des processus de neurodégénérescence. En particulier, il aidera à déterminer dans quelle mesure la formation des endoperoxydes lipidiques constitue une étape importante des dommages des neurones lors de l'anoxie? De plus, il permettra de vérifier si la formation de ces composés pourrait se voir réduite chez ces souris surexprimant la GSHPx humaine? En effet, cette question demeure entière.

4.2 La protection hippocampale et le degré d'expression de la GSHPx

La section précédente a soulevé l'importance de démontrer le lien précis qui existe entre le niveau d'expression de la GSHPx humaine chez les souris transgéniques et le degré de protection neuronale dans la région CA₁ de l'hippocampe observé lors d'une période transitoire d'anoxie. En effet, nous avons constaté, lors de cette étude, que la résistance à l'anoxie peut varier selon les lignées de souris transgéniques, et ce, indépendamment du niveau d'insertion du nombre de transgènes codant pour la GSHPx humaine dans le génome de la souris. Cette observation soulève une interrogation, à savoir si l'insertion du gène GSHPx est obligatoirement le paramètre moléculaire déterminant le niveau de protection neuronale. À cet égard, nous avons vérifié si le niveau de protection neuronale observé après divers traumatismes cérébraux peut être affecté chez des descendants provenant du

croisement des parents transgéniques homozygotes avec des souris non-transgéniques. Cette procédure a eu comme conséquence la naissance d'une génération de souris hémizygotes contenant la moitié des transgènes de la GSHPx de leurs parents transgéniques. Les résultats obtenus démontrent bien que les changements biochimiques chez les descendants hémizygotes ont altéré le phénotype de ces souris quand à leur résistance à l'anoxie. Ces données viennent témoigner de l'importance de la GSHPx comme déterminant du phénotype chez ces souris. Toutefois, plusieurs questions restent à poser quant à la variation de la résistance à l'anoxie dans nos différentes lignées de souris transgéniques. Par exemple, on peut se demander si la variation de la résistance à l'anoxie dans les différentes lignées n'est pas le résultat d'altérations cellulaires indépendantes du niveau d'expression en GSHPx humaine. En effet, existe-t-il une différence quant à la distribution dans les types cellulaires de l'hippocampe de la GSHPx selon les différentes lignées de souris? Ou encore, l'insertion du transgène exerce-t-elle son action en modifiant tout simplement le niveau d'expression de gènes distincts pouvant conférer cette protection neuronale, tels les gènes pour les facteurs de croissance? De plus, est-il possible que la modulation par d'autres systèmes biochimiques de régulation cellulaire (kinases, phosphatases, etc.), de l'activité de la GSHPx soit différenciellement affectée selon les lignées de souris transgéniques? Ces interrogations ne sont là que quelques exemples de questions soulevées par la présente étude en ce qui concerne les caractéristiques moléculaires conférant la résistance à l'anoxie chez les souris transgéniques pour la GSHPx. Nous discuterons ici chacune de ces possibilités.

Compte tenu de la nature hautement aléatoire de l'insertion d'un fragment d'ADN dans un génome, on peut reconnaître d'emblée la faible probabilité qu'une localisation unique du transgène soit obtenue dans toutes les lignées de souris transgéniques pour la GSHPx humaine. Par conséquent, il est à se demander si l'insertion différentielle du transgène codant pour la GSHPx humaine dans le génome de différentes lignées de souris aura comme conséquence d'affecter le profil de distribution hippocampale de cette enzyme? À cet égard, trois grands types cellulaires caractérisent les aspects structuraux et fonctionnels de la région hippocampale (Harris et Cotman., 1986). Par exemple, le premier type, les cellules pyramidales, confère à l'hippocampe sa grande excitabilité neuronale et constituent les bases cellulaires des processus d'apprentissage et de mémoire. Ces neurones utilisent principalement le glutamate comme neuromédiateur et sont, de plus, très vulnérables aux diverses conditions neuropathologiques. Les neurones en panier, deuxième type cellulaire, ont, pour leur part, une fonction inhibitrice capitale vouée au contrôle du niveau d'excitabilité de la structure hippocampale. L'acide Gamma amino-butyrique (GABA) représente ici le neurotransmetteur par excellence de ce type cellulaire, fait à remarquer, un grand nombre d'agents neuropharmacologiques interfèrent avec les récepteurs du neuromédiateur GABA. Les cellules gliales, troisième grand type cellulaire, assureront, pour leur part, des fonctions de soutien métabolique vitales pour les neurones. Il demeure important de vérifier si la variation dans le degré de protection neuronale observée dans nos différentes lignées de souris transgéniques n'est pas la conséquence d'une distribution différentielle de la GSHPx dans les divers types cellulaires. Ces études permettront de cibler

les types cellulaires de l'hippocampe qui confèrent la résistance à l'anoxie chez les souris transgéniques pour la GSHPx humaine.

Bien que moins probable, on ne peut exclure, pour le moment, la possibilité que d'autres gènes codant pour des système cellulaires distincts de la GSHPx humaine aient vu leur expression modifiée par l'insertion du transgène dans le génome de la souris. En effet, des expériences similaires à la notre ont montré qu'il est possible de perturber l'expression des gènes constitutifs d'une cellule par l'insertion d'un transgène et d'affecter ainsi, les caractéristiques phénotypiques des tissus concernés (Watson et coll., 1992). Par exemple, on a pu mettre en évidence que l'expression de certains gènes liés aux processus moléculaires de l'embryogenèse voient leur activité totalement modifiée par l'insertion d'un transgène de type oncogène. Est-il possible que l'insertion du transgène pour la GSHPx humaine chez la souris ait modifié les propriétés biochimiques de d'autres systèmes cellulaires endogènes connus pour protéger les neurones contre diverses lésions?

À cet égard, il fut récemment démontré que certains facteurs de croissance cellulaire peuvent posséder une capacité intrinsèque à stimuler l'activité endogène des enzymes antioxydants et contribuer, ainsi, aux mécanismes de protection neuronale qui surviennent lors de la stimulation excessive des neurones glutamatergiques. L'un de ces facteurs de croissance, le BDNF (facteur neurotrophique dérivé du cerveau), possède la capacité à stimuler la GSHPx endogène, un effet qui semble fort probablement être sous la gouverne

d'un système cellulaire spécifique de phosphorylation, celui de la tyrosine kinase (Ying et coll., 1993).

Ainsi, il est possible d'imaginer que la résistance neuronale conférée par la GSHPx humaine dans la région CA₁ de l'hippocampe puisse être, en partie du moins, la conséquence d'une altération du niveau d'expression des facteurs de croissance ou de leurs récepteurs. À cet égard, il sera particulièrement intéressant de préciser si la réponse différentielle à l'anoxie n'est pas le résultat d'une variation dans l'habileté des facteurs de croissance à stimuler la GSHPx. Il n'est pas impensable non plus que le degré de la résistance à l'anoxie soit déterminé par la capacité qu'ont les facteurs de croissance à modifier l'état de phosphorylation cellulaire. Nul doute que ces études concernant l'effet du BDNF sur le niveau d'activité de la tyrosine kinase dans nos différentes lignées de souris transgéniques présenteront un grand intérêt.

4.3 Les propriétés électrophysiologiques et biochimiques des récepteurs au glutamate chez les souris transgéniques pour la GSHPx

La participation du neurotransmetteur qu'est le glutamate comme système cellulaire impliqué dans le développement de diverses conditions de neurodégénérescence neuronale est maintenant bien reconnue. Tel que mentionné précédemment, un grand nombre d'expériences ont montré que l'activation excessive d'un sous-type de récepteur pour le neuromédiateur glutamate, le récepteur NMDA, constitue une étape clef dans le

déroulement des événements biochimiques conduisant à la mort des neurones (Choi et coll., 1990). Selon le modèle accepté, une libération massive du glutamate favoriserait l'activation maximale des récepteurs de type NMDA et, ainsi, une entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule.. Cette accumulation de calcium dans les neurones provoquerait le déclenchement d'une série de réactions biochimiques conduisant à la formation de dérivés actifs de l'oxygène. La région CA_1 de l'hippocampe est particulièrement riche en récepteurs NMDA, ce qui lui confère une grande vulnérabilité face à de multiples traumatismes cérébraux. Fait intéressant, il est clair maintenant que l'activation excessive des récepteurs NMDA est étroitement liée aux dommages cellulaires de l'hippocampe générés lors de l'anoxie cérébrale (Lipton et coll., 1988). Il est donc pertinent de se demander si la protection neuronale chez les souris transgéniques pour la GSHPx humaine n'est pas uniquement le résultat d'une réduction de réponses des récepteurs NMDA pour le glutamate.

À la section 3 du présent travail, nous nous sommes questionnés sur cette possibilité d'une perte fonctionnelle dans la réponse NMDA chez les souris transgéniques pour la GSHPx humaine. Il a été démontré que l'application d'une courte période de stimulation tétanique dans la région CA_1 de l'hippocampe entraîne une altération permanente de l'efficacité des synapses glutamatergiques à transmettre l'influx nerveux. La potentialisation de la fonction neuronale dans cette région du cerveau est maintenant reconnue pour nécessiter l'activation des récepteurs NMDA, et elle est facilement bloquée par l'application préalable d'antagonistes spécifiques pour ces récepteurs (Larson et coll., 1988). En étudiant le développement de la potentialisation neuronale, on constate que le degré de ce

phénomène n'est pas affecté par l'expression de la GSHPx humaine chez la souris transgénique. Cette observation, en accord avec les données biochimiques sur les récepteurs NMDA, suggère qu'une perte de la réponse NMDA pour le glutamate ne peut être invoquée comme cause moléculaire de la résistance à l'anoxie chez les souris transgéniques pour la GSHPx.

Il est à noter que la question d'un dérèglement glutamatergique fut abordée sous l'angle d'une perturbation des récepteurs de type NMDA. Cependant, la possibilité d'une altération des propriétés moléculaires et fonctionnelles des autres types de récepteurs pour le glutamate n'est pas à négliger. En particulier, il sera important de vérifier les impacts de l'insertion du transgène pour la GSHPx humaine sur les caractéristiques biochimiques et fonctionnelles des récepteurs métabotropes (ACPD) et ionotropes (AMPA et kainate) pour l'acide glutamique. L'implication potentielle de ces autres systèmes de récepteurs a aussi été proposée pour le développement de diverses conditions neuropathologiques chez l'animal (Kovalchuk et coll., 1994 ; Clark et coll., 1987).

4.4 La glutathione peroxydase et les maladies neurodégénératives chroniques

Lorsque l'on considère l'implication des dérivés actifs de l'oxygène dans la neurodégénérescence, il est difficile de ne pas considérer le rôle potentiel que pourraient jouer ces composés lors du développement de conditions pathologiques associées au

vieillessement du cerveau, comme la maladie d'Alzheimer et de Parkinson. Bien que de nombreuses recherches tentent de démontrer une participation cruciale des radicaux libres dans les maladies neurodégénératives associées au vieillissement (Poirier et coll., 1993), aucune étude n'a, jusqu'à ce jour, pu établir un lien de causalité entre l'apparition de diverses conditions pathologiques et la formation des dérivés actifs de l'oxygène. En effet, on ne possède que très peu d'informations sur la nature et l'origine des radicaux libres pouvant induire les dommages cellulaires lors du vieillissement normal ou pathologique.

Le processus complet du transport d'électrons, présent au niveau de la structure mitochondriale, est depuis fort longtemps reconnu comme source principale de production en dérivés actifs de l'oxygène. Fait intéressant, on a démontré qu'une perturbation de la fonction mitochondriale pourrait être associée au vieillissement prématuré du cerveau (Rolf et coll., 1994). Selon le modèle retenu, à mesure que l'on perturberait la fonction mitochondriale lors du vieillissement, une réduction dans la capacité de cette structure cellulaire à maintenir les besoins énergétiques pourrait survenir. Ces effets auraient comme conséquence de perturber l'ensemble des mécanismes biochimiques contrôlant l'homéostasie cellulaire, en particulier ceux modulant le niveau de calcium intracellulaire. À cet égard, certains auteurs croient que la neurodégérescence observée lors du vieillissement peut résulter d'une entrée permanente, mais modérée, de calcium dans les cellules nerveuses (Harman et coll., 1981 ; Stadtman et coll., 1991). Cette entrée de calcium dans les neurones pourrait être assurée par une activation soutenue des récepteurs NMDA au cours du vieillissement, ce qui favoriserait subséquemment l'établissement de la cascade du

métabolisme de l'acide arachidonique, une autre source importante de formation de radicaux libres.

L'apparition de diverses conditions chroniques de neurodégénérescence ne serait pas uniquement le résultat d'un déséquilibre mitochondrial ou d'une formation excessive de métabolites dérivés de l'hydrolyse de l'acide arachidonique. En effet, une production accrue de radicaux libres pourrait survenir lors d'altérations permanentes du métabolisme du fer et des catécholamines dans la maladie de Parkinson (Rolf et coll., 1994). De plus, il a été proposé que les effets neurotoxiques d'une protéine normalement liée à l'apparition de la maladie d'Alzheimer, la β -amyloïde, puisse produire une partie de ces effets par la production des dérivés actifs de l'oxygène (Anador et coll., 1996). Fait intéressant, des données récentes obtenues dans notre laboratoire ont montré que la surexpression de la β -amyloïde humaine chez des souris transgéniques peut augmenter les déficits fonctionnels de l'hippocampe générés par l'anoxie. De plus, on a constaté que la surexpression de la β -amyloïde perturbe, de façon permanente, la capacité des neurones glutamatergiques à produire le modèle électrophysiologique de la mémoire qu'est la potentialisation neuronale.

Il ne fait aucun doute qu'il serait intéressant de vérifier si une hausse de l'activité GSHPx ne peut pas renverser les déficits cellulaires produits par la surexpression de la β -amyloïde chez les souris transgéniques. Comment les descendants, provenant du croisement d'un parent transgénique pour la β -amyloïde avec celui surexprimant la GSHPx, verront-ils

leur phénotype affecté? Est-ce que la vulnérabilité des neurones glutamatergiques conférée par la β -amyloïde sera réduite par la surexpression de la GSHPx humaine chez ces souris?

Grâce à ces expériences, nous espérons mettre en lumière l'importance de la GSHPx humaine comme mécanisme biochimique à exploiter pour augmenter le niveau de protection neuronale lors du vieillissement normal et pathologique.

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent qu'une augmentation modérée de l'activité de la GSHPx humaine est suffisante pour conférer une protection neuronale des neurones de l'hippocampe suite à une courte période d'anoxie. Compte tenu de l'importance des neurones de l'hippocampe dans le stockage de l'information, nous proposons que la hausse du niveau d'activité en GSHPx peut être un facteur déterminant afin de réduire les déficits cognitifs qui suivent bien souvent les dommages anoxiques. L'identification de facteurs biochimiques capables de conférer la résistance des souris transgéniques lors de l'anoxie pourrait nous aider à mieux comprendre les mécanismes susceptibles de participer à l'établissement des dommages neuronaux dans les accidents vasculaires cérébraux. D'autre part, l'ensemble des informations recueillies à l'aide de ce modèle transgénique nous permettra assurément de cibler de nouvelles stratégies thérapeutiques vouées au traitement des affections neurodégénératives.

RÉFÉRENCES

- Annadora, J.B., Malfroy, B & Michel, B. (1996). β -amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures : Protection by EUK-8, a synthetic catalytic free radical scavenger., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 2312-2316.
- Arai, A., Kessler, M & Lee, K. (1990a). calpain inhibitors improve the recovery of synaptic transmission from hypoxia in hippocampal slices., *Brain Res*, 532, 63-68.
- Arai, A., Larson, J. & Lynch, G. (1990b). Anoxia reveals a vulnerable period in the developpement of long-term potentiation., *Brain Res*, 511 :353-7.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B. & Dizdaroglu. (1989). Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase., *J. Biol. Med.*, 264 :13024-13028.
- Aust, S.D., Morehouse, L.A. & Thomas, C.E. (1985). Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Radical. Biol. Med.*, 1, 3-7.
- Bandry, B., Davison, A.J. (1990). Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implication for carcinogenesis and aging. *Free Radical. Biol. Med.*, 8 :523-539.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, P.A., Marshall, P.A. & Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by perxynitrite., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 :1620-1624.

- Behl, C., Davis, J., Cole, G.M. & Schubert, D. (1992). Vitamine E protects nerve cells from amyloid β protein toxicity., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 186 :944-950.
- Behl, C., Davis, J.S., Lesley, & Schubert, D. (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity., *Cell*, 77 :817-827.
- Bekkers, J & Stevens, C.F. (1990). Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus., *Nature*, 346 :724-729.
- Benveniste, H. (1991). The excitotoxin hypothesis in relation to cerebral ischemie. *Cerebrovasc., Brain. Meta. Rev.*, 3 :213-245.
- Benzi, G., Pastoris, F., Marzatico, F., Viula, R.F., Dagani, F. & Curti, D. (1992). The mitochondrial electron transfert alteration as a factor involved in the brain aging., *Neurobiology*, 13 :361-368.
- Betz, A.L., Randal, J & Martz, D. (1991). Xanthine oxidase is not a major source of free radicals in focal cerebral ischemia., *Physiology*, 260 :H563-568.
- Bliss, T.V.P. & Lomo, T. (1973). Long-Lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate areas of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path., *Physiology*, 232 :331-356.
- Bliss, T.V.P. & Collingridge, G.L. (1993). A synaptique model of memory:long-term potentiation in the hippocampus., *Nature*, 361 :31-39.
- Boveris, A., Cadenas, E. & Stoppani, A.O.M. (1976). Role of ubiquinone in the mithochondrial generation of hydrogen peroxide., *Biochemistry*, 156 :435-444.

- Cadenas, E., Boveris, E.A., Ragan, C.I. &. (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol- cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria., *EMBO*, 180 :248-257.
- Cadet, J.L., Katz, M., Jackson-lewis, V. & Fahn, S. (1989). Vitamine E attenuates the toxic effects of intrastriatal injection of 6-OHDA in rats., behavioral and biochemical evidence., *Brain Res*, 476 :10-15.
- Cao, W., Carney, J.M., Duchon, A., Floyd, R.A. & Chevion, M. (1988). Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain., *Neuroscience*, 88 :233-238.
- Carrier, C., Petrov, P. & Mirault, M.E. (1993). Intracellular localization of glutathione peroxidase in T47D human breast cell transfectants., *NCI Symposium*, Honey Harbour, Ontario, Canada, S2, 1121-1128.
- Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBrain, W. & Harrison, P.R. (1986). The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: The selenocysteine in the active site is encoded by the termination codon, TGA., *EMBO*, 5:131-142
- Chan, P.H. (1996). Role of oxidants in ischemic brain-damage., *Stroke*, 6 :1124-1129.
- Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs., *Physiol. Rev.*, 59 :527-606.
- Choi, D., Maulucci-Gedde, M. & Kriegstein, A.R. (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture., *Neuroscience*, 7 :357-368.

- Chu, F., Doroshow, J.H. & Esworthy, R.S. (1993). Expression, characterization, and tissue distribution of a new selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI., *J. Biol. Chem.*, 268 :2571-2576.
- Clark, G.D. & Rothman, S.H. (1987). Blockade of excitatory amino acid receptors protects anoxic hippocampal slices., *Neuroscience*, 21 :665-671.
- Cochrane, C. (1991). Mechanisms of oxidant injury of cells., *Mol. Asp. Med.*, 12 :137-147.
- Choi, D.W & Rothman, S.M. (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death., *Neuroscience*, 13 :171-182.
- Congy, F., Bonnefont-Rousselot., Dever, S & Emerit, J. (1995). Étude du stress oxydant chez le sujet âgé., *Presse Méd.*, 24 :1115-1118.
- Cowan, D.B., Weisel, R.D., Williams, W.G. & Mickle, D.A.G. (1993). Identification of oxygen responsive elements in the 5'-flanking region of the human glutathione peroxidase gene., *Biol. Chem.*, 268 :26904-26910.
- Crastes de Paulet, A. (1990). Radicaux libres et vieillissement., *Biol. Clin.*, 48 :323-330.
- Davies, K.J.A. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals., *Biol. Chem.*, 262 :9895-10004.
- Dawson, T.M., Dawson, V. & Snyder, S.H. (1992). A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide., *Neurology*, 32 :297-311.

- Dawson, D.A., Masayasu, H., Graham, D.L. & Macrac, I.M. (1995). The neuroprtective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral., *Neuroscience*, 185, 65-69.
- De-la- Ascunciuon, J., Millan, R.Pla, Bruseghini, L., Esteras,F.V., Pallardo, J., Sastre, J. & Vina, V. (1996). Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA., *FASEB*, 10 :333-338.
- Deisseroth, A. (1970). Catalase: Physical and chimical properties, mechanism of catalysis and physiological role., *Physiol, Rev.*, 50 :319-319.
- Fadden, A.I., Demediuk, P., Panter, S.S. & Vink, R. (1989). The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury., *Science*, 244 :798-800.
- Flohé, L. (1982). Glutathione peroxidase brought into focus., *Free Radic. Biol.*, 5 :223-254..
- Flohé, L., Gunzler, W.A. & Schock, H.H. (1973). Glutathione peroxidase:a selenoenzyme., *FEBS*, 32 :132-134.
- Floyd, R & Carney, M. (1992). Free radical damage to protein and DNA: Mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress., *Neurology*, 32 :S22-S27.
- Fridovich, I. (1970). Qualitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase., *J. Biol. Chem.*, 245 :4053-4061.
- Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutase., *Biochemistry*, 44 :147-159.

- Fridovich, I. (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant., *J. Pharmacol. Toxicol.*, 23 :239-257.
- Fulvio, U., Matilde, M & Carlo, G. (1985). The selenoenzyme phospholipid hydroperoxyde glutathione peroxidase., *Bioch. Biophy.*, 839 :62-70.
- Geiger, P., Thomas, J.P. & Girotti, A. (1991). Lethal damage to murine L1210 cells by exogenous lipid hydroperoxides:protective rôle of dependant selenoperoxidases., *Arach. Biol. Bioph.*, 288 :671-680.
- Geiger, P.G., Lin, F. & Girotti, A.W. (1993). Selenoperoxidases-mediated cytoprotection against The damaging effects of ter-butyl hydroperoxide on leukemia cells., *Free Radical. Biol. Med.*, 14 :251-266.
- George, J., Siegel / Bernard, W., Agranoff, R., Wayne, B & Molinoff. (1994). Glial cell developpment., *Neurochemistry*, 5 :598-601.
- Gill, R., Foster, A.C & Wooddruff, G.N. (1987). Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegenération in the gerbil., *Neuroscience*, 7 :3343-3349.
- Glenner, GG. & Wong, CG. (1984). Initial report on the purification and carактерization of a novel cerebrovascular amyloid protein., *Biochem. Biophy. Res. Comm.*, 120 :885-890.
- Greenamyre, J.T. & Porter, R.H. P. (1994). Anatomy and physiology of glutamate in the CNS., *Neurochemistry*, 44 (S8): 7-13.

- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D. & Crowther, R.A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary of Alzheimer's disease., *Neuron*, 3 :519-26.
- Gutteridge, J.M.C. (1993). Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence., *Free Rad. Res. Comm.*, 19 :141-158.
- Haber, F & Weiss, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salt., *Proc. Soc. London.*, 147 :332-351.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and central nervous system., *neurochemistry*, 5 :1609-1615.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy., *Lancet*, 1 :1396-1398.
- Hang-Xiang, D., Afif, H., John, T., Zafar, I., Annarueber, C., Wu-Yen, Hung., Elizabeth, D., Getzoff, P., Brain, H., Raymond, P., Carolyn, W., Gang, D., Edwin, S., Celestine S., Hans, P., Aftab, A., Allen, R., Robert, H., Margaret, P., Pericak, V & Teepu, S. (1993). Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase., *Science*, 261 :1047-1050.
- Harris, E.W & Cotman, C.W. (1986). Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists., *Neuroscience*, 70 :132-137.
- Harman, D. (1956). Aging a theory based on the free radical and radiation chemistry., *Gerontol*, 11 :298-300.

- Harman, D. (1981). The aging process., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78 :7124-7128
- Harrison, W.W., Netsky, M.G. & Brown, M.D. (1968). Trace element in human brain: copper, zinc, iron and magnesium., *Clin. Chem. Acta.*, 21 :55-60.
- Hensley, K., Carney, J.M., Mattson, M.P, Aksenova, M., Harris, M., Wu, J.F., Floyd. A. & Butterfield, D.A. (1994). A model for β -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91 :3270-3274.
- Kang, J., Lemaire HG., Unterbeck, A., Salbaum, JM., Masters, CL., Grzeschik, KH. & Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor., *Nature*, 325 :733-736.
- Kedderis, G.L. & Miwa, G.T. (1988). The metabolic activation nitroheterocyclic therapeutic agents., *Drug. Metab. Rev.*, 19, 33-39.
- Kitagana, K., Matsumoto, M., Oda, T., Niinobe, M., Handa, N., Fukunaga, R., Isaka, Y., Kimura K., Maeda, H. & Kamada, T. (1990). Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death., *Neuroscience*, 35 :551-558.
- Konto, H.A. & Wei, E.P. (1986). Superoxide production in the experimental brain injury., *Neuroscience*, 64 :803-807.
- Koh, J.Y., Yang, L.I. & Cotman, W.C. (1990). β -amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage., *Brain Res*, 533 :315-520.

- Kovalchuk, Y., Miller, B., Sarantis, M & Attwell. (1994). Arachidonic acid depress non-NMDA receptor currents., *Brain Res*, 643 :287-295.
- Kretz-Rémy, C., Mehlen, P., Mirault, M-E & Arrigo, A.P. (1996). Inhibition of I κ B- α phosphorylation and degradation and subsequent NF- κ B activation by glutathione peroxidase overexpression., *Cell. Biol.*, 133 :1-11.
- Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M. & Bockarert, J. (1993). NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity., *Nature*, 364 :535-537.
- Larson, J., Wong, D & Lynch, G. (1989). Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for induction of long-term potentiation., *Brain Res*, 368 :347-350.
- Lavoie, L., Tremblay, A. & Mirault, M.E. (1992). Distinct oxidoresistance phenotype of human T47D cells transfected by rat glutathione S-transferase Yc expression vectors., *Biol. Chem.*, 267 :3632-3636.
- Lawrence, R.A., Sunde, R.A., Schwartz, G.L & Hoekstra, W.G. (1974). Glutathione peroxidase activity in rat lens and other tissues in relation to dietary selenium intake., *Exp. Eye. Res*, 18 :563-569.
- Lee, K., Olivier, M. & and Mirault, ME. (1981). Electron microscopic studies of brain slices: the effects of high frequency stimulation on dendritic ultrastructure. In *Electrical activity in isolated mammalian CNS preparations.*, Acad. Press, New York., 189-212.
- Lipton, P., Raley, K. & Lobner, D. (1988). Long-term inhibition of synaptic transmission and macromolecular synthesis following anoxia in the rat hippocampal slice; interaction between calcium and NMDA receptors, In G. Somjen (ED), *Mechanisms of cerebral hypoxia and stroke* Plenum, New York, 229-249

- Lûddens, H & Wisden, W. (1991). Function and pharmacology of multiple GABA receptor subunits., *Pharmacology*, 12 :49-51.
- Luft, R. (1994). The development of mitochondrial medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91 :8731-8738.
- Markund, S.L. (1982). Human copper-containing superoxyde dismutase of high molecular weight., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79 :7634-7638.
- Martinovits, G., Melamed, E., Cohen, O., Rosenthal, J & Uzzan, A. (1986). Systemic administration of antioxidants does not protect mice against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP)., *Neurosciences*, 69 :192-197.
- Mattson, M.P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I. & Rydel, R.E. (1992). β -amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *Neurology*, 12 :376-389.
- McBride, O.W., Mitchell, A., Lee, B.J., Mullenbach, G. & Hatfield, D. (1988). Gene for selenium-dependent glutathione peroxidase maps to human chromosome 3,21 and X., *Biofactors*, 1 :285-292.
- McCord, J. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury., *New England J. Med.*, 312 :159-163.
- Mirault, M-E. (1992). Phenotypes of transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase. *Proc. Ann. Assoc. Cancer. Res.*, 33, 183-190.

- Mirault, M-E., Tremblay, A., Beaudouin, N & Tremblay, M. (1991). Overexpression of seleno-glutathione peroxidase by gene transfer enhances the resistance of T47 D human breast cell to clastogenic oxidants. *J. Biol. Chem.*, 266 :20752-20760.
- Mirault, M.E., Tremblay, A., Trépanier, G., Furling, D., Pothier, F., Dipaolo, T & Puymirat. (1993). Molecular biology of aging., *Cell. Biochem.*, 17D, 163-169.
- Mirault, M.E., Tremblay, A., Furling, D., Trépanier, G., Dugré, F., Pymirat, J & Pothier, F. (1994). Transgenic mice models for neuroprotection studies., *Ann. New York. Acad. Sci.*, 738 :104-115.
- Mills, G.C. (1957). Hemoglobin catabolism: Glutathione peroxidase erythrocyte enzyme which protect hemoglobin from oxidative damage., *Biol. Chem.*, 229 :189-197.
- Mirochnitchenko, O., Palnitkar, U., Philbert, M. & Inouye, M. (1995). Thermosensitive phenotype of transgenic mice overproducing human glutathione peroxidases., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92 :8120-8124.
- Moscow' J.A., Morrow, C.S., He, R., Mullenbach, G.T. Cowan, K.H. (1992). Structure and function of the 5-flanking sequence of the human cytosolic selenium-dependent glutathione peroxidase gene., *Biol. Chem.*, 267 :5949-5958.
- Mullenbach, G.T., Tabrizi, A., Irvine, B.D., Bell, G.I. & Hallewell, R.A. (1987). Sequence of cDNA coding from human glutathione peroxidase confirms TGA encodes derivat selenocysteine., *Nucleic Acid. Res*, 15 :5484-5490.
- Musleh, W., Bruce, A., Malfroy, B. & Baudry, M. (1994). Effects of EUK-8, a synthetic catalytic superoxide scavenger, on hypoxia-and acidosis-induced damage in hippocampal slices., *Neuropharmacology*, 33 :922-934.

- Nalbantoglu, J., tirado-Santiago., Lahsaini, A., Poirier, J., Goncalves, O., Momoli, F., Welner, S.A., Massicotte, G., Julien, J-P & Shapiro, M.L. (1997). Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxyterminus of the Alzheimer amyloid precursor protein., *Nature*, 387 :500-505.
- Ngo, E.O., Sun, T.P., J.Y., Wang, C.C., Chi, K.W., Cheng, A.L. & Nutter, L.M. (1991). Menadione-induced DNA damage in a human tumor cell line., *Biochem. Pharmacol.*, 42 (10) :1961-1968.
- Ohtsuki, T & Kamada, T. (1995). Reperfusion induces 5-lipoxygenase translocation and leukotriene C₄ production in ischemic brain., *Physiology.*, H1249-H1257.
- Pacifici, R.E & Davies, K.J.A. (1991). Protein lipid and DNA repair systems in oxidative stress: The free radical theory of aging revisited., *Gerontology*, 37 :166-180.
- Pelmont, J. (1984). Les sous produits de l'oxygène., *Enzymes*, Chapitre 27 :515-517.
- Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B & Plum, F. (1982). Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia., *Neurology*, 11 :491-498.
- Poirier, J. and Thiffault, C. (1993). Are free radicals involved in the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease., *Neurology*, 33 :38-43.
- Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B. & Plum, F. (1982). Temporal profile of neuronal damage in a model transient forebrain ischemia., *Neurology.*, 11 : 491-498.
- Prohaska, J.R., & Ganther, H.E. (1977). Glutathione peroxidase activity of glutathione-S-transferases purified from rat liver., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 76 :437-445.

- Pryor, W. (1986). Oxy-radicals and related species: Their formation, lifetimes, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.*, 48 :657-667.
- Ritchie, K & Robine, J.M. (1994). La démence sénile en France: une estimation de la charge actuelle et projection des tendances de futur., *Médecine/Science*, 10 :680-686.
- Sies, H. (1994). Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic., *Free Rad. Biol. Med.*, 14 :313-323.
- Smith, L.L. (1987). The mechanism of paraquat toxicity in the lung., *Rev. Biochem. Toxicol.*, 8 :37-41.
- Southorn, P.A & Powis, G. (1988). Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic relations., *Clin. Proc.*, 63 :381-389.
- Stadtman, E.R. & Oliver, C.N. (1992). Metal-catalyzed oxidation of proteins., *Biol. Chem.*, 266 :2005-2008.
- Subbarao, K.V., Richardson, J.S. & Ang, L.C. (1990). Autopsy of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro., *Neurochem*, 55 :342-345.
- Takahashi, K., Avissar, N., Whitin, J. & Cohen, H. (1987). Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from known cellular enzyme., *Arach. Biochem. Biophys.*, 256 :677-687.
- Trépanier, G., Furling, D., Puymirat, J & Mirault, M.E. (1996). Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adulte mouse brain., *Neurosci*, 75, 231-243.

- Watson, J., Arman, M., Wtkowski, J & Zoller, M. (1992)., Recombinant DNA. New York: Scientific American Books, 256-272.
- Yanker, B.A., Duffy, L.K. & Kirschner, D.A. (1990). Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides., *Science*, 250 :279- 283
- Yim, M.B., Chock, P.B. & Stadman, E.R. (1993). Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator., *Biol. Chem.*, 268 :4099-4105.
- Yu, B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species., *Physiology*, 74 :139-162.
- Yosida, T., Watanabe, M., Engelman, D.T., Schley, R.M., Maulik, J.A., Ho, Y.S., Oberley, T.D. & Das, D.K. (1996). Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase are resistant to myocardial ischemia reperfusion injury., *J. Mol. Cell Cardiol.*, 28 :1759-1767.
- Yu, B.A., Suescun, E.A & Yang, S.Y. (1992). Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A₂ : modulation by dietary restriction., *Mech. Ageing. Dev.*, 65 :17-33.
- Zhang, L., Maiorino, M., Roveri, A. & Ursini, F. (1989). Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: specific activity in tissues of rats of different age and comparison with other glutathione peroxidases., *Bioch. Biophys. Acta.*, 1006 :140-143.